UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE REGULATION DER BILDUNG GLYKOLYTISCHER ENDPRODUKTE IN MARINEN INVERTEBRATEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
ULRIKE KREUTZER
aus Dortmund

Düsseldorf
1987

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543909_0027

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE REGULATION DER BILDUNG GLYKOLYTISCHER ENDPRODUKTE IN MARINEN INVERTEBRATEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Ulrike Kreutzer
aus Dortmund

Düsseldorf, 1987

1. Berichterstatter: Professor Dr. M.K. Grieshaber
2. Berichterstatter: Professor Dr. K.D. Spindler

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 1987

Herrn Professor Dr. M.K. Grieshaber danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft und für die großzügige und engagierte Förderung meiner Arbeit.

Ferner gilt mein Dank den ehemaligen und den jetzigen Mitarbeitern des Instituts für Zoologie IV, die mich so tatkräftig unterstützt haben. Herrn Dr. B. Siegmund, und Herrn Dr. R. Wiesner verdanke ich viele anregende Diskussionen und so manchen praktischen Rat. Herrn Dr. H.-O. Pörtner sei für seine Hilfe bei der Berechnung der intrazellulären pH-Werte gedankt.

INHALT

		Seite
1.	**Einleitung**	1
2.	**Material und Methoden**	17
2.1	Tiermaterial	17
2.2	Präparation der Introvertretraktoren	17
2.3	Isometrische Kontraktion	17
2.3.1	Inkubationsgefäß	18
2.3.2	Inkubationsmedium	20
2.3.3	Begasung	20
2.3.4	Versuchsdurchführung	21
2.3.5	Auswertung der Kraftaufzeichnung	22
2.4	Eingrabversuche	23
2.5	Inkubation ruhender Muskeln unter hypoxen Bedingungen	23
2.6	Extraktion der Metabolite	24
2.6.1	Perchlorsäureextrakte	24
2.6.2	NaOH-Extrakte	24
2.6.3	Bestimmung des Extraktvolumens	25
2.7	Quantitative Metabolitbestimmungen	25
2.7.1	Bestimmung mit Hilfe der enzymatischen optischen Tests	25
2.7.2	Säulenchromatographische Bestimmungen	26
2.7.3	Bestimmung von NADH	26
2.8	Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs	28
2.9	Bestimmung des intrazellulären pH	29
2.9.1	Experimentelle Bestimmung des pH_i	30
2.9.2	Näherungsberechnung zur Bestimmung des pH_i	30

2.10	Untersuchung der Opindehydrogenasen	31
2.10.1	Aktivitätstest	31
2.10.2	Proteinbestimmung	31
2.10.3	Bestimmung der Opindehydrogenaseaktivität in Rohextrakten	31
2.10.4	Reinigungsschema	32
2.10.5	Rohextrakt	32
2.10.6	Ammoniumsulfatfällung	33
2.10.7	Gelfiltration	33
2.10.8	Anionenaustauschchromatographie	33
2.10.9	Rechromatographie über Mono Q	35
2.10.10	Reinigung von FPLC-Säulen	35
2.10.11	Chromatofokussierung	36
2.10.12	Elektrophoresen	36
2.10.13	Bestimmung des Molekulargewichts	37
2.10.14	Bestimmung der Substrataffinitäten	37
2.10.15	Extrapolierung der physiologischen Enzymaktivitäten	38
2.11	Bestimmung der apparenten Gleichgewichtskonstanten der Octopin- und der Strombindehydrogenasereaktion	39
2.12	Chemikalien	40
2.12.1	Käufliche Chemikalien	40
2.12.2	Octopin- und Alanopin/Strombindehydrogenase	40
2.12.3	Alanopin und Strombin	41
2.13	Geräte	43
2.14	Berechnung der ATP-, ADP- und AMP-Gehalte anhand des Myokinase- und des Argininkinasegleichgewichts	44

3.	**Ergebnisse**	46
3.1	Der Introvertretraktor - Biotopbedingte und funktionsbedingte Anaerobiose -	46
3.1.1	Isometrische Kontraktion unter Normoxie und Hypoxie	46
3.1.2	Sauerstoffverbrauch	53
3.1.3	Aktivität unter hypoxen Bedingungen in vivo	55
3.1.4	Inkubation ruhender Muskeln unter hypoxen Bedingungen	57
3.2	Die Pyruvatreduktasen - Aktivität und Eigenschaften -	60
3.2.1	Aktivitäten und Enzymmuster in verschiedenen Muskelgeweben	61
3.2.2	Reinigung	65
3.2.3	Eigenschaften	68
3.3	Parameter der Pyruvatreduktasereaktion bei funktionsbedingter und biotopbedingter Anaerobiose	75
3.3.1	Opin-, Aminosäure-, Pyruvat-, NADH und NAD^+-Gehalte bei Aktivität und Hypoxie	76
3.3.2	Bestimmung und Abschätzung des intrazellulären pH-Wertes	80
3.3.3	Apparente Gleichgewichtskonstante der Octopin- und der Strombindehydrogenasereaktion	
4.	**Diskussion**	84
4.1	Funktionsbedingte Anaerobiose unter Normoxie und Hypoxie	85
4.1.1	Die aerobe Energiegewinnung	85
4.1.2	Das Phosphagen	90
4.1.3	Anaerobe Glykolyse und Succinatgärung	97
4.1.4	Funktionsbedingte "Hypoxie" ?	98

4.2	Der Dualismus der anaeroben Endproduktbildung	103
4.2.1	Muskelaktivität und langfristige Hypoxie	104
4.2.2	Die Opindehydrogenasen	107
4.2.3	Das Reaktionsgleichgewicht	114
4.2.4	Wechselwirkungen der Pyruvatreduktasen mit anderen Dehydrogenasen	127
4.3.	Pyruvatreduktasen und Evolution	130
5.	**Zusammenfassung**	134
6.	**Literatur**	136

1. EINLEITUNG

Zur langfristigen Aufrechterhaltung ihrer Lebensfunktionen benötigen die meisten tierischen Organismen Sauerstoff. Die Oxidation der Nahrungssubstrate zu CO_2 und Wasser stellt die effektivste Form der heterotrophen Energiegewinnung dar. So reicht einem Radfahrer die Energie aus 200 g Glukose unter normalen Bedingungen für eine Radtour vom Düsseldorfer Landtag bis zum Kölner Dom. Würde er, rein theoretisch, die gleiche Glukosemenge unter Sauerstoffausschluß vergären, so käme er mit der gewonnenen Energie nicht einmal bis zur Düsseldorfer Südbrücke.

Eine ausschließlich aerobe und damit ökonomische Energiebereitstellung ist jedoch immer an ein kontinuierliches Sauerstoffangebot im Biotop eines Tieres gebunden, da molekularer Sauerstoff im Gegensatz zu den Nahrungssubstraten nur in relativ geringem Umfang in Organismen oder Zellen gespeichert werden kann. Neben dieser ökologischen Begrenzung der aeroben Energiegewinnung besteht auch eine funktionelle, die vor allem solche Organe oder Gewebe betrifft, die große Spannen in ihrem Energiebedarf aufweisen. Die aerobe Energiebereitstellung läßt sich nicht beliebig steigern, da sie durch die Kapazität des Sauerstofftransports oder durch die Kapazität der Mitochondrien begrenzt wird.

Fast alle Organismen besitzen Mechanismen, um außerhalb dieser ökologischen und funktionellen Grenzen der aeroben Lebensweise ihre Energiebereitstellung für kürzere oder längere Zeit durch einen anaeroben Stoffwechsel aufrecht erhalten zu können (Hochaka & Somero, 1984). Zebe et al. (1980) prägten für die Fähigkeit eines Tieres, für längere Zeit unter hypoxen oder anoxen Bedingungen zu überleben, den Begriff "biotopbedingte" Anaerobiose, und für die Fähigkeit bei starker Muskelaktivität durch anaeroben Stoffwechsel Energie zu gewinnen, den Begriff "funktionsbedingte" Anaerobiose.

UNIV. LEIDEN BIBL.

Das Spektrum der Organismen oder Organe, die an einen Sauerstoffmangel in der "Umwelt" angepaßt sind, reicht vom Spulwurm Ascaris lumbricoides, der ganze Abschnitte seines Lebenszyklus im hypoxen Milieu des Dünndarms verbringt (Bunge, 1889), über die Miesmuschel Mytilus edulis, die bei Gefahr der Austrocknung ihre Schalen hermetisch verschließt und unter experimentellen Bedingungen bis zu 35 Tage ohne Sauerstoffzufuhr überleben kann (Theede et al., 1969), bis zu einigen Vertebraten, wie z. B. dem Goldfisch, der seinen Energiebedarf ebenfalls für Stunden oder Tage durch einen anaeroben Stoffwechsel decken kann (Shoubridge & Hochachka, 1980). Selbst ein Organ, das an aerobe Bedingungen angepaßt ist, wie z. B. die Säugerniere, gewinnt im inneren Markbereich Energie aus dem anaeroben Stoffwechsel (Schmidt & Thews, 1985).

Im funktionellen Bereich sind Anpassungen besonders in solchen Organen ausgeprägt, die große Unterschiede in ihrem minimalen und maximalen Energiebedarf aufweisen, wie z. B. in vielen Muskeln. Die Fähigkeit zur anaeroben Energieproduktion bietet ihnen die Möglichkeit, die Energieproduktion unabhängig vom Sauerstoffangebot und der mitochondrialen Kapazität zu steigern und hat sogar oft zu einer weitgehenden Reduktion der Mechanismen des Sauerstofftransports und des Mitochondriengehalts geführt. Das wohl bekannteste Beispiel dafür sind die weißen Skelettmuskelfasern der Vertebraten.

Unter den marinen Invertebraten gibt es einige, die beiden Situationen ausgesetzt sein können und fähig sind, sowohl längere Perioden der Hypoxie zu überdauern als auch ihren gesteigerten Energiebedarf in "flight or fight" Situationen auf anaerobem Wege zu decken. Der augenfällige Unterschied zwischen einem passiven Überdauern und einer aktiven Reaktion führte zu der Frage, ob in diesen beiden Situationen auch unterschiedliche Mechanismen der Energieproduktion wirksam werden.

Die Wege der anaeroben Energiegewinnung

Durch eine Vielzahl von Untersuchungen sind die prinzipiellen Möglichkeiten der anaeroben Energiegewinnung heute weitgehend aufgeklärt. Zunächst stand dabei die Anaerobiose im arbeitenden Vertebratenmuskel im Vordergrund (z.B. Berzelius, 1848, Fletcher & Hopkins, 1907). Mit der Entdeckung ungewöhnlicher glykolytischer Endprodukte in marinen Mollusken (Van Thoai & Robin, 1959; Grieshaber & Gäde, 1976; s. S.6) fand auch die funktionsbedingte Anaerobiose der Invertebraten zunehmend Beachtung. Vier prinzipielle Mechanismen, der anaerobe ATP-Produktion sind in Abbildung 1 zusammengefaßt und im Folgenden näher erläutert.

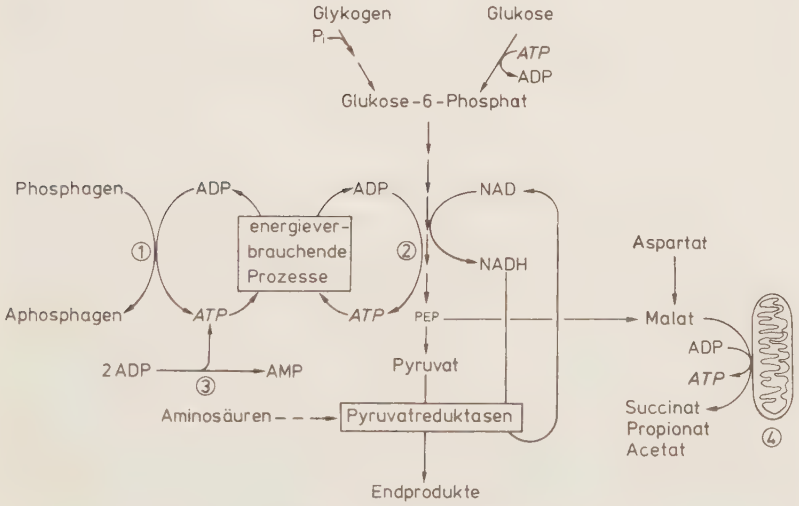


Abbildung 1: Mechanismen der anaeroben Energiegewinnung. **1** Phosphagenkinase, **2** Substratkettenphosphorylierung, **3** Adenylatkinase, **4** Succinatgärung.

1. Die Phosphagenkinasereaktion

Die Muskeln vieler Vertebraten und Invertebraten enthalten phosphorylierte Guanidiniumverbindungen (Phosphagene), deren Phosphatgruppe auf ADP übertragen werden kann (Van Thoai & Roche, 1964). Creatinphosphat übernimmt die Rolle dieses Energiespeichers bei den Vertebraten (Lohmann, 1934). Bei den Invertebraten ist es, neben anderen Verbindungen, häufig das L-Argininphosphat (Meyerhof, 1928). Es wird generell angenommen, daß sowohl die Creatinkinase als auch die Argininkinase *in vivo* nahe ihrem Gleichgewicht arbeiten (Veech, 1978; Graham et al., 1986). Damit stellen die Phosphagene eine äußerst schnell mobilisierbare Energiequelle dar, die vor allem in der Anfangsphase der Aktivität, bei hohem Energiebedarf, eine bedeutende Rolle spielt (z. B. Howald, 1980; Grieshaber, 1982; Kreutzer, 1982; Hochachka, 1985a). Verglichen mit der ATP-Menge, die potentiell aus dem anaeroben Glykogenabbau zur Verfügung steht (s.u.), ist die Menge an derart gespeichertem energiereichen Phosphat jedoch relativ gering. Die Phosphagengehalte der meisten Muskeln liegen unter 50 umol/g FG (Beis & Newsholme, 1975).

In den letzten Jahren mehren sich die Befunde, daß dem Phosphagen und der Phosphagenkinase neben seiner Rolle als "Puffer" des ATP-Gehalts (Wilson et al., 1981) auch eine wichtige Rolle beim intrazellulären Transport energiereichen Phosphats zukommt. Eine erleichterte Diffusion von energiereichem Phosphat analog dem Myoglobin/O_2 System wird von Meyer et al. (1984) diskutiert. Bessman & Geiger (1981) postulieren dagegen für den Vertebraten Skelettmuskel eine Kompartimentierung des intrazellulären ATP, so daß die Diffusion energiereichen Phosphats von den Mitochondrien zu den Myofibrillen ausschließlich in Form von Creatinphosphat verläuft.

2. Die Substratkettenphosphorylierungen der Glykolyse.

Als Substrate der anaeroben Glykolyse kommen prinzipiell Glukose oder Glykogen in Frage, was zum einen für die Regulation, zum anderen für die ATP-Ausbeute der Glykolyse unterschiedliche Konsequenzen hat. Bei den marinen Invertebraten ist vor allem Glykogen die Ausgangssubstanz, das als intrazellulärer Energiespeicher z. B. bei der Miesmuschel bis zu 35% des Trockengewichts eines Muskels ausmacht und mit bis zu 390 umol Glykosyleinheiten/g FG eine äußerst ergiebige Energiequelle darstellt (De Zwaan & Zandee, 1972). Die ATP-Ausbeute des Embden-Meyerhof-Weges liegt ausgehend vom Glykogen bei 3 Mol ATP pro Mol Glykosyleinheiten, also etwas höher als bei der Vergärung von Glukose (2 Mol ATP pro Mol), jedoch, immer noch um den Faktor 13 unter der ATP-Ausbeute bei vollständiger Oxidation (39 Mol ATP pro Mol Glykosyleinheit). Entsprechend dieser geringen Energieausbeute der anaeroben Glykolyse ist eine hohe Netto-ATP-Produktion immer mit einer erheblichen Steigerung der Glykolyserate verbunden. Bei Invertebraten wurden bei starker Muskelaktivität Steigerungen auf das 20 bis 60fache des Ruhewertes gefunden (De Zwaan et al., 1980a; Pörtner et al., 1984a).

Das bei der Oxidation des Glycerinaldehyds anfallende NADH muß, um die Aufrechterhaltung des Glykolyseflusses zu gewährleisten, durch eine terminale Pyruvatreduktase wieder reoxidiert werden. Im Vertebratenmuskel katalysiert die L-Laktatdehydrogenase die Reduktion von Pyruvat zu Laktat (Fletcher & Hopkins, 1907). In einigen Crustaceen und Mollusken nimmt die D-Laktatdehydrogenase diese Stelle ein (Long & Kaplan, 1968). In vielen Anneliden und Mollusken erfolgt eine reduktive Kondensation von Pyruvat mit einer Aminosäure (s. Abbildung 2), die von den Enzymen Octopin-, Alanopin-, Strombin- und Tauropindehydrogenase katalysiert werden kann (Van Thoai & Robin, 1959; Fields, 1976; Sato & Gäde, 1986). Diese Enzyme werden, in Anlehnung an Schell et al. (1979), auch als "Opindehydrogenasen" bezeichnet.

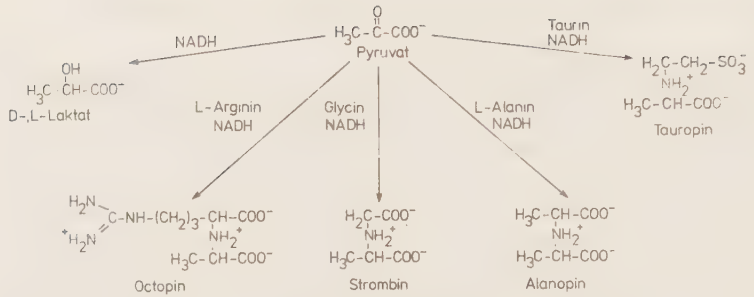


Abbildung 2: Reaktionen der Pyruvatreduktasen

Interessanterweise lassen sich in diesen Tieren oft bis zu vier verschiedene Pyruvatreduktaseaktivitäten in demselben Gewebe nachweisen (Livingstone, 1983). Bei Muskelaktivität wird jedoch meist nur eines der potentiellen Endprodukte akkumuliert (Meinardus & Gäde, 1981; Pörtner et al., 1984a; Siegmund et al., 1985).

3. Die Adenylatkinasereaktion

Die durch die Adenylatkinasereaktion katalysierte Transphosphorylierung von 2 ADP zu ATP und AMP trägt in den meisten untersuchten Systemen quantitativ nur wenig zur Netto-ATP-Produktion bei. Sie spielt aber unter Umständen eine wichtige Rolle für regulatorische Prozesse, da sie bei absinkendem ATP-Gehalt das Verhältnis der Adenylate untereinander bzw. die relative Änderung der Adenylatkonzentrationen beeinflußt. Als regulatorische Parameter vieler Stoffwechselreaktionen werden der "energy charge" = (0.5 ADP + ATP)/(ATP + ADP + AMP) (Atkinson, 1968) und das Phosphorylierungspotential $\simeq$ ATP/(ADP $\cdot$ P_i) diskutiert. Letzteres schließt auch das beim Phosphagen- und ATP-Abbau entstehende anorganische Phosphat ein und steht in Beziehung zur freien Energie der Hydrolyse des ATP (Nishiki et al., 1978).

Die experimentelle Bestimmung dieser Parameter mit den konventionellen Methoden der Stoffwechselphysiologie ist aller-

dings in letzter Zeit zunehmend der Kritik ausgesetzt, da in vivo Messungen mit Hilfe der Kernresonanzspektroskopie die schon 1952 von Perry berichtete Beobachtung bestätigten, daß die in Gewebeextrakten gemessenen ADP-, AMP- und P_i-Gehalte nicht den Gehalten an freien Metaboliten in der Zelle entsprechen (Gadian et al., 1981; Graham et al., 1986). Viele Autoren weichen auf eine Berechnung der ADP- und AMP-Gehalte über die Myokinase- und die Phosphagenkinasereaktion aus (Veech, 1978).

4. Die Succinatgärung

Viele marine Invertebraten können ihren Energiebedarf für Stunden, Tage oder sogar Wochen durch anaerobe Prozesse decken und boten sich daher als Versuchsobjekte für die Untersuchung der Energiegewinnung unter vermindertem Sauerstoffangebot an. Unter langdauernder Hypoxie werden die Metabolite Succinat, Acetat und Propionat in den Geweben dieser Tiere akkumuliert. Abbildung 3 zeigt das von Schöttler (1982) zusammengefaßte Stoffwechselschema der Succinatgärung des Pierwurms Arenicola marina (Zebe, 1975; Schroff & Schöttler, 1977; Schöttler et al., 1984), das in seinen Grundzügen auch für andere marine Invertebraten gilt (Collicut & Hochachka, 1977; De Zwaan & Dando, 1984).

Danach verläuft der anaerobe Energiestoffwechsel in den ersten Stunden der Anaerobiose über eine Transaminierung der Aminogruppe des Aspartats auf glykolytisch gebildetes Pyruvat zum Alanin. Das dabei gebildete Oxalacetat wird unter Wahrung der Redoxbalance zu Malat reduziert. Das Malat wird in den Mitochondrien unter ATP-Gewinn zum Teil zu Acetat oxidiert und zum Teil durch die Fumaratreduktase zu Succinat reduziert. Ein weiterer ATP-Gewinn resultiert aus der Decarboxylierung des Succinats zu Propionat. Sowohl Succinat als auch Acetat und Propionat können ins umgebende Medium ausgeschieden werden. In der Spätphase der Anaerobiose, nach weitgehender Reduktion des Aspartatpools, erfolgt die Bildung von Oxalacetat durch eine Carboxylierung glykoly-

tisch gebildeten Phosphoenolpyruvats, die durch das Enzym Phosphoenolpyruvatcarboxykinase katalysiert wird.

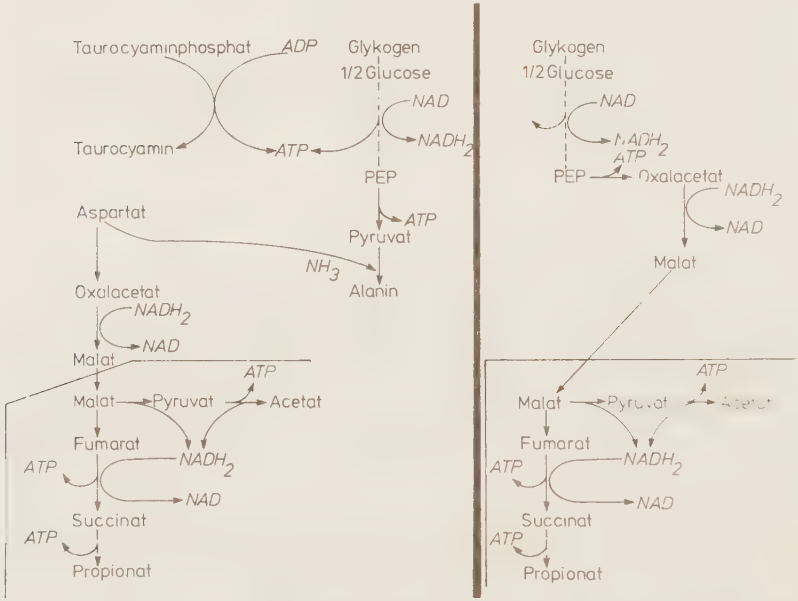


Abbildung 3: Stoffwechselschema der Succinatgärung des Pierwurms Arenicola marina; links Anfangsphase, rechts Spätphase der biotopbedingten Anaerobiose (aus Schöttler, 1982).

Während die Fähigkeit zur Bildung von Acetat, Propionat und anderen kurzkettigen Fettsäuren auf die Invertebraten beschränkt zu sein scheint, konnte eine Synthese von Succinat aus Fumarat unter hypoxen Bedingungen auch in so hochgradig aerob angepaßten Geweben wie dem Säugerherzen nachgewiesen werden (Wiesner, 1986). Diese Reaktion verdient auch in sofern Beachtung, als durch Untersuchungen an isolierten Mitochondrien von Vertebraten und Invertebraten nachgewiesen werden konnte, daß sie einen Teil der Atmungskette einbezieht, (Wilson & Cascarano, 1970; Schöttler, 1977) und damit wohl den unmittelbarsten "Berührungspunkt" zwischen

aerobem und anaerobem mitochondrialen Stoffwechsel darstellt.

Die Umstellung vom aeroben auf den anaeroben Stoffwechsel geht bei biotopbedingter Anaerobiose mit einer generellen Reduktion des Stoffwechsels einher, der nach 48 h Hypoxie z. B. in Mytilus edulis nur noch 5 - 10 % des Ruhestoffwechsels unter Normoxie beträgt (De Zwaan & Wijsman, 1976; Shick et al., 1983). Welche Signale diese Reduktion bewirken, die auch als "umgekehrter Pasteur-Effekt" bezeichnet wird, und wie diese Energie im einzelnen eingespart wird, ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Einige Hypothesen wurden in jüngster Zeit von Hochachka (1985 b) und Storey (1985) vorgeschlagen.

Die Umschaltung von der ökonomischen aeroben auf eine - vermeintlich verschwenderische - anaerobe Energieproduktion bei funktionsbedingter Anaerobiose, hat vielfach auch die Frage aufgeworfen, welcher Parameter letztendlich die aerobe Energiebereitstellung begrenzt. Zwei Möglichkeiten werden diskutiert: 1. Auf Grund einer intrazellulären Hypoxie steht den Mitochondrien nicht genügend Sauerstoff zur Verfügung; oder 2. Auch bei ausreichendem Sauerstoffangebot kommt die ATP-Lieferung der Atmungskette dem steigenden Energiebedarf nicht nach.

Die Diskussion wurde vor allem durch den Befund entfacht, daß die Cytochromoxidase, der terminale Elektronenakzeptor der Atmungskette, eine sehr hohe Sauerstoffaffinität besitzt. Der Halbsättigungsdruck (p_{50}) dieses Enzyms liegt unter 0.2 Torr (Oshino et al., 1974). Die Sauerstoffpartialdrucke, bei denen man das Einsetzen der anaeroben Energiegewinnung in vielen Organismen beobachtet, liegen dagegen bei weit höheren Werten. Im Vertebratenmuskel setzen schon bei einem arteriellen Partialdruck von 75 Torr anaerobe Mechanismen ein (Jones, 1986), bei Invertebraten , wie z.B. dem Spritzwurm Sipunculus nudus liegt dieser "kritische Sauerstoffpartialdruck" bei einem äußeren p_{O2} von 20 - 30 Torr (Pörtner et al., 1985).

Generell wird angenommen, daß den Mitochondrien auch bei relativ hohen äußeren Partialdrucken nicht genug Sauerstoff zur Verfügung steht. Jones (1986) macht hohe intrazelluläre Diffusionsgradienten für Sauerstoff dafür verantwortlich. Einige Autoren finden jedoch Evidenzen, daß auch bei ausreichender Oxygenierung der Mitochondrien schon eine Laktatproduktion einsetzt (Connett et al., 1984). Paul (1983) postuliert, daß im glatten Vertebratenmuskel aerob gebildetes ATP von der Myosin-ATPase, glykolytisch gebildetes ATP aber von den Ionenpumpen umgesetzt wird.

Der Dualismus der anaeroben Endproduktbildung

In dem von Schöttler (1982) für die Energiegewinnung bei biotopbedingter Hypoxie zusammengefaßten Stoffwechselschema (s. Abbildung 3) fehlte zunächst eine Beteiligung der "klassischen" anaeroben Glykolyse an der anaeroben Energiegewinnung, da in vielen Tieren keines der bis dahin bekannten typischen Endprodukte (D-,L-Laktat und Octopin) nachgewiesen werden konnte. Diese Auffassung veränderte sich grundlegend, als Collicut & Hochachka (1977) Alanopin als Endprodukt der anaeroben Glykolyse im hypox inkubierten Herz der Auster Crassostrea gigas vermuteten. Die nachfolgenden Untersuchungen an anderen fakultativen Anaerobiern bestätigten die Beteiligung des Embden-Meyerhof-Weges an der Energieproduktion unter biotopbedingter Hypoxie. Hatten noch Zebe et al. (1980) die grundsätzlichen Unterschiede zwischen der Energiegewinnung bei biotopbedingter und funktionsbedingter Anaerobiose betont, nämlich die Succinatgärung auf der einen, den Embden-Meyerhof-Weg und den Phosphagenabbau auf der anderen Seite, so liegt in der Beteiligung des Embden-Meyerhof-Weges doch eine Gemeinsamkeit beider Anaerobiosetypen.

Umso überraschender war der Befund, daß von Tieren, die sowohl zur funktionsbedingten als auch zur biotopbedingten Anaerobiose fähig sind, bei Aktivität ein anderes Endprodukt der anaeroben Glykolyse gebildet wird, als bei langfristiger

Hypoxie (Meinardus & Gäde, 1981). Abbildung 4 illustriert diesen Befund: Die Herzmuschel Cardium tuberculatum akkumuliert bei "Fluchtsprüngen" Octopin und bei 24 h Hypoxie D-Laktat (Meinardus-Hager & Gäde, 1986a); der Pierwurm Arenicola marina bildet bei wiederholtem Eingraben ins Sediment Alanopin und bei 24 h Hypoxie Strombin (Siegmund et al., 1985); der Spritzwurm Sipunculus nudus bildet bei der gleichen Aktivität Octopin, jedoch bei 24 h Hypoxie ebenfalls Strombin (Pörtner et al., 1984a).

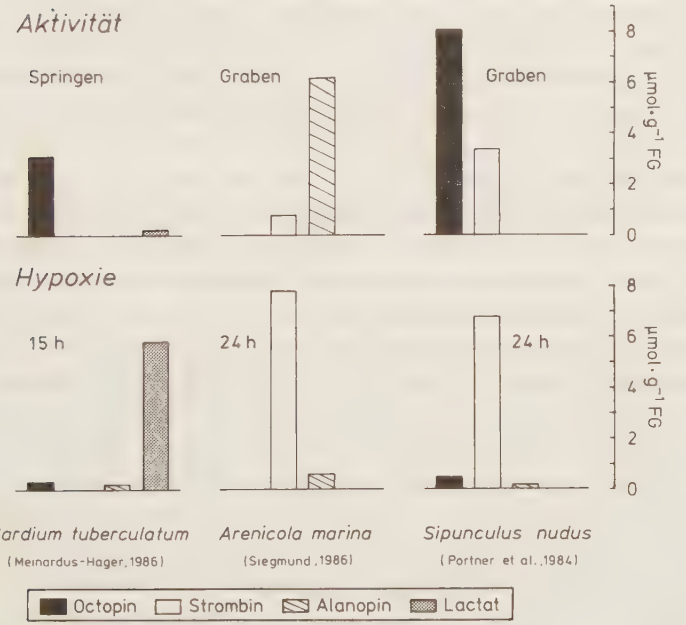


Abbildung 4: Endprodukte der anaeroben Glykolyse (ΔKontrolle - Experiment, umol/g FG) nach Aktivität und nach 24 h Hypoxie in den marinen Invertebraten Arenicola marina (Siegmund, 1986), Cardium tuberculatum (Meinardus-Hager, 1986) und Sipunculus nudus (Pörtner et al., 1984a).

Trotz dieses vermeintlichen Paradoxons, kam man mehr und mehr zu der Auffassung, daß den beiden "Stress"-Situationen, heftige Muskelaktivität und Hypoxie im Biotop, grundsätzlich die gleichen Mechanismen der Energiegewinnung zuzuordnen sind. So schließen De Zwàan & Putzer (1985) aus einem Vergleich der Endproduktbildung verschiedener Spezies, daß alle der genannten Mechanismen sowohl unter biotopbedingter als auch unter funktionsbedingter Hypoxie operieren, und daß der Unterschied in der Endproduktbildung (glykolytische Endprodukte auf der einen, glykolytische Endprodukte, Succinat und Fettsäuren auf der anderen Seite) durch eine höhere Kapazität der anaeroben Glykolyse gegenüber der Succinatgärung zustande kommt. Diese Erklärung beantwortet jedoch nicht die Frage, warum den beiden Situationen zwar die Beteiligung der anaeroben Glykolyse bis zum Pyruvat gemeinsam ist -womit auch die ATP-Ausbeute dieselbe bleibt-, die Reduktion des Pyruvats jedoch zu unterschiedlichen Produkten führt.

Die Regulation der anaeroben Glykolyse und auch der Succinatgärung wurde in vielen Organismen untersucht. Ein generelles Regulationsprinzip ist dabei die Aktivierung oder Inhibierung von Schlüsselenzymen, die entweder durch allosterische (Metabolite) oder durch kovalente Modifikation (Phosphorylierung) erfolgt. Beispiele dafür sind die Glykolyseenzyme Glykogenphosphorylase, Phosphofructokinase und Pyruvatkinase, sowie die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase der fakultativ anaeroben Invertebraten, die neben der Pyruvatkinase am Verzweigungspunkt der anaeroben Glykolyse und des Succinatweges steht (s. Grieshaber, 1982; De Zwaan & Dando, 1984; Hochachka, 1985 b). Ein ähnliches Prinzip wäre für die Regulation der glykolytischen Endproduktbildung denkbar.

Die Pyruvatreduktasen vieler mariner Invertebraten katalysieren die reduktive Kondensation von Pyruvat mit einer Aminosäure (s. Abbildung 3). Diese "Opindehydrogenasen" sind meist monomere Proteine mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 40 000 (Übersicht der Untersuchungen an Opindehydrogenasen bei De Zwaan & Dando, 1984 und Gäde & Grieshaber, 1986). Am besten untersucht ist die schon 1959 von Van Thoai

& Robin entdeckte Octopindehydrogenase. In vielen Fällen wurde eine relativ breite Substratspezifität der Opindehydrogenasen für verschiedene Aminosäuren nachgewiesen (Ellington, 1980; Storey & Dando, 1982). Unter dem Aspekt der Regulation der glykolytischen Endproduktbildung in Tieren, die einen Dualismus der anaeroben Glykolyse zeigen, stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob ein unspezifisches Enzym oder mehrere Proteine mit unterschiedlicher Aminosäurepräferenz die Bildung verschiedener Endprodukte der anaeroben Glykolyse katalysieren.

Die Opindehydrogenasen unterliegen einer starken Hemmung durch die Produkte der Reaktion, in einigen Fällen wurde auch eine Hemmung durch die Adenylate sowie durch Succinat und Propionat gefunden. Generell wird vermutet, daß die Enzymaktivität in erster Linie über die Substrataffinität reguliert wird. Für die Octopindehydrogenase z.B. vermutet Hochachka (1980), daß ein Anstieg der Substrate Pyruvat und Arginin (aus dem Phosphagenabbau) bei starker Muskelaktivität zu einer Aktivierung des Enzyms führt und so die Octopinbildung ermöglicht. Unterschiedliche Substrataffinitäten der Opindehydrogenasen sowie unterschiedliche Substratkonzentrationen während funktionsbedingter und biotopbedingter Hypoxie könnten ein potentieller Mechanismus der Regulation des Dualismus der glykolytischen Endproduktbildung sein.

Das Versuchstier

Der marine Sipunculide Sipunculus nudus L. (Abbildung 5) zeigt diesen Dualismus in ausgeprägter Form (s. Abbildung 4). Die Atem- und Stoffwechselphysiologie, sowie Einzelheiten zur Lebensweise des Tieres wurden in einer detaillierten Untersuchung von Pörtner (1982) dokumentiert. Die Tiere leben im Sediment der Gezeitenzone und des Sublitorals in Bauten, die durch eine vertikale Atemhöhle mit dem Oberflächenwasser verbunden sind. Bei überstehendem Wasser erzeugen sie durch Pumpbewegungen des Hautmuskelschlauchs

einen einwärts gerichteten Wasserstrom, der der Sauerstoffversorgung und damit dem aeroben Stoffwechsel dient (Pörtner, 1982).

Wie viele andere Tiere der Gezeitenzone besitzt Sipunculus nudus jedoch auch die Fähigkeit, längere Perioden der Hypoxie zu überdauern, wie sie unter Umständen bei Ebbe, durch Sauerstoffzehrung im Sediment, oder durch Verschüttung der Atemhöhle zustande kommen können. Im Experiment wird eine solche Hypoxie meist durch Inkubation der ruhenden Tiere in stickstoffbegastem Seewasser simuliert. Unter diesen Bedingungen werden von Sipunculus nudus Succinat, Acetat und Propionat gebildet. Die Beteiligung der anaeroben Glykolyse an der Energiegewinnung bei langfristigem Sauerstoffmangel blieb in der Arbeit von Pörtner (1982) zunächst unberücksichtigt. Erst nachdem eine ausreichend sensitive Bestimmungsmethode für Alanopin und Strombin zu Verfügung stand (Siegmund & Grieshaber, 1983) konnte Strombin als glykolytisches Endprodukt identifiziert werden (Pörtner et al., 1984a).

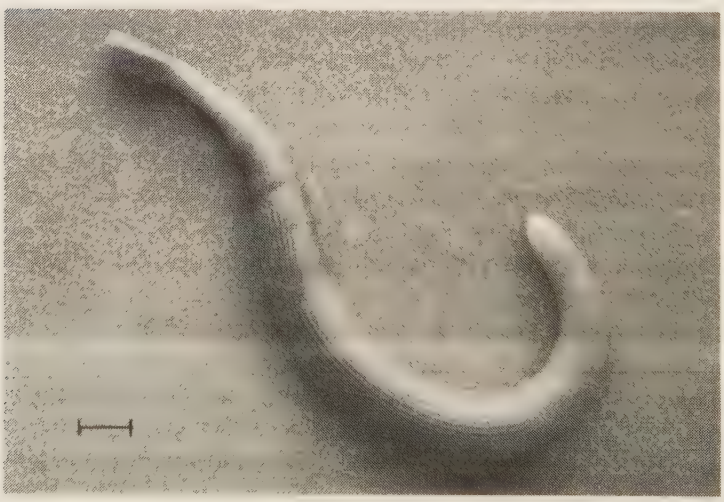


Abbildung 5: Der Spritzwurm Sipunculus nudus L. (⊢⊣ = 1cm).

Die Tiere können sich, wenn sie freigespült werden, innerhalb kürzester Zeit wieder in das schützende Sediment eingraben. Bei mehrmaligem Eingraben wird L-Argininphosphat, das Phosphagen des Tieres, mit ADP zu ATP und L-Arginin transphosphoryliert, und Octopin akkumuliert als Endprodukt der anaeroben Glykolyse.

Die vier Introvertretraktoren des Tieres, die in situ dem Einziehen des für die Sipunculida typischen Introverts dienen, lassen sich problemlos präparieren und durch elektrische Stimulation zur Kontraktion bringen. In diesen Muskelpräparaten werden unter normoxen, isometrischen Bedingungen bei einer Kontraktionsfrequenz von 0.1 Hz innerhalb einer Stunde 4.8 umol/ g FG Octopin gebildet (Kreutzer, 1982). Ein solches Präparat bietet gegenüber in vivo Untersuchungen den Vorteil, daß der Muskel unter definierten Bedingungen für einen bestimmten Zeitraum stimuliert werden kann, während gleichzeitig seine Kraftentwicklung meßbar ist. Der isolierte Introvertretraktor schien daher besonders geeignet, die Wege der Energiebereitstellung und den Dualismus der glykolytischen Endproduktbildung bei Aktivität und Hypoxie zu untersuchen.

Der anaerobe Energiestoffwechsel zweier weiterer Spezies, Cardium tuberculatum und Arenicola marina, die ebenfalls unterschiedliche glykolytische Endprodukte in unterschiedlichen physiologischen Situationen akkumulieren (s. Abbildung 4), wurde parallel von Meinardus-Hager (1986) und Siegmund (1986) bearbeitet. Ihre Ergebnisse führten zu einer Hypothese, die den Dualismus der anaeroben Glykolyse folgendermaßen erklärt: Bei biotopbedingter, langfristiger Anaerobiose katalysieren alle Opindehydrogenasen nahe ihrem Reaktionsgleichgewicht. Da nur geringe Unterschiede in den Gleichgewichtskonstanten bestehen, akkumuliert vorwiegend das Opin, dessen korrespondierende Aminosäure in der höchsten Konzentration vorhanden ist. In den kurzen Zeiträumen funktionsbedingter Anaerobiose, können dagegen nur solche Dehydrogenasen ihr Reaktionsgleichgewicht einstellen, die in hohen Aktivitäten im Gewebe vorhanden sind, so daß vorwie-

gend das Opin akkumuliert, dessen korrespondierende Dehydrogenase die höchste Kapazität aufweist. Wendet man diese Hypothese auf den Dualismus der anaeroben Endproduktbildung in Sipunculus nudus an, so muß postuliert werden, daß sich die Octopindehydrogenase sowohl bei funktionsbedingter als auch bei biotopbedingter Anaerobiose nahe dem Gleichgewicht befindet. Erstaunlicherweise wird jedoch bei erschöpfender Grabtätigkeit sehr viel mehr Octopin gebildet als während 24 stündiger Hypoxie (s. Abbildung 4). Diese scheinbare Diskrepanz sollte durch weitere Untersuchungen über den Opinstoffwechsel mariner Invertebraten geklärt werden.

Die vorliegenden Arbeit zum Dualismus der anaeroben Endproduktbildung an isolierten Muskelpräparaten des Spritzwurms Sipunculus nudus wurden unter folgenden Einzelaspekten durchgeführt:

1. Hat Hypoxie einen Einfluß auf die Endproduktbildung bei Aktivität?

2. Welchen Anteil an der Energiebereitstellung haben die einzelnen anaeroben Stoffwechselwege bei Aktivität und unter Sauerstoffmangel in Ruhe?

3. Wie unterscheiden sich die Pyruvatreduktasen des Tieres in ihren Eigenschaften? Katalysieren verschiedene Enzymproteine die Bildung der Endprodukte Octopin und Strombin, oder handelt es sich um dasselbe, von Haas et al. (1973) als Octopindehydrogenase beschriebene Protein?

4. Läßt sich anhand der Metabolitveränderungen und der kinetischen Eigenschaften der Enzyme der Dualismus der Endproduktbildung erklären?

5. Wie verändern sich die Parameter, die in das Reaktionsgleichgewicht der Opindehydrogenasen eingehen unter Aktivität und Hypoxie?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tiermaterial

Die Versuchstiere wurden im März an der bretonischen Küste in der Nähe von Morgat (Frankreich) gesammelt und in gekühltem Seewasser nach Düsseldorf transportiert. Dort wurden sie in einer Seewasser-Anlage bei 12 - 14°C gehältert. Das Seewasser wurde aus einem Seesalzgemisch der Firma Wiegandt (Krefeld) hergestellt, die Salinität betrug 1100 mOsmol. Die Hälterungsbecken waren zu etwa 1/3 mit Sand aus dem Biotop der Tiere gefüllt, so daß sie die Möglichkeit hatten, sich einzugraben und Nahrung aufzunehmen. Futter wurde nicht verabreicht. Für die Enzympräparation wurden zum Teil Tiere verwendet, die aus der Nähe von Loquemeaux (Bretagne, Frankreich) stammten, und deren Hautmuskelschläuche direkt nach dem Sammeln präpariert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurden.

2.2 Präparation der Introvertretraktoren

Die Leibeshöhle der Tiere wurde im caudalen Bereich eröffnet, so daß die Coelomflüssigkeit ablaufen konnte. Dann wurde der Hautmuskelschlauch dorsomedian durchschnitten und auf einem Präparierbrett festgesteckt. Darm und ventraler Nervenstrang ließen sich leicht entfernen. Die Retraktoren (s. Abbildung 6) wurden vorsichtig von Mesenterien freipräpariert, einzeln an den Ansatzstellen abgeschnitten und sofort in synthetisches Seewasser (s. 2.3.2) überführt.

2.3 Isometrische Kontraktion

An isolierten Introvertretraktoren wurden durch elektrische Reizung Serien von isometrischen Einzelkontraktionen ausgelöst; um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern, wurden sie kontinuierlich mit synthetischem Seewasser beträufelt. Durch Begasung mit Luft/CO_2- bzw. Stickstoff/CO_2- Gemischen

konnten normoxe bzw. hypoxe Bedingungen erzeugt werden. Der für Versuche unter normoxen Bedingungen beschriebene Versuchsaufbau (Kreutzer, 1982) wurde in den Grundzügen beibehalten, zur Erzeugung hypoxer Bedingungen waren jedoch einige Modifikationen notwendig (s. 2.3.1, 2.3.3)

Eine elektrische Reizung von Muskeln, die ganz in das Medium eingetaucht sind, hätte den experimentellen Aufwand verringert und wurde in Vorversuchen erprobt. Ein solcher Versuchsaufbau erwies sich jedoch als ungünstig, da Seewasser eine hohe Leitfähigkeit besitzt und daher, auch bei hohen Spannungen, nur verhältnismäßig schwache Kontraktionen ausgelöst werden.

Abbildung 6: Präparat von Sipunculus nudus, →Retraktoren.

2.3.1 Inkubationsgefäß

Das zweiteilige Inkubationsgefäß (s. Abbildung 7) wurde von der Glaswerkstatt der Universität Düsseldorf angefertigt. Im Unterteil befindet sich eine der beiden beweglichen Platin-Reizelektroden, ein Auffangbecken und Auslaß für das Medium sowie eine Begasungseinrichtung. Im Oberteil befinden sich

zwei seitliche Öffnungen, die die zweite Platinelektrode und die Beträufelungspipette aufnehmen und durch Quickfit-Verschlüsse abgedichtet werden können. Durch ein Kapillarrohr, das gleichzeitig dem Druckausgleich dient, ist ein Wolframdraht geführt, der den Transducer (Statham-Universal-Zelle UC 2 für Zug- und Druckkraft) mit einer Glaskugel verbindet. Ober- und Unterteil verbinden zwei gefettete Schliffe. Der Muskel wurde mit dem einen Ende an die Glaskugel, mit dem anderen Ende auf den Glasbulbus der unteren Reizelektrode geklebt (Cyanacrylat-Klebstoff, Bostik GmbH, Oberursel), so daß sich das Ende des Platindrahtes im Muskelgewebe befand. Das Inkubationsgefäß wurde kontinuierlich mit dem entsprechenden Gasgemisch (s. 2.3.3) durchströmt.

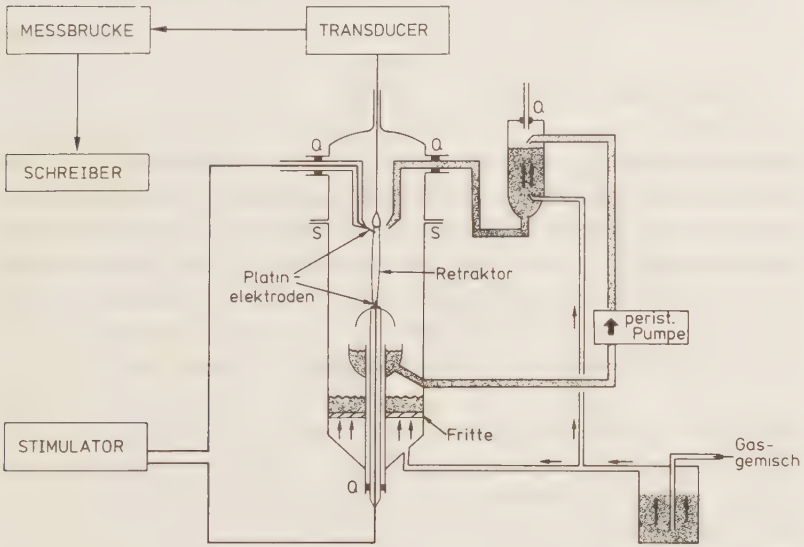


Abbildung 7: Versuchsapparatur zur Stimulation isolierter Introvertretraktoren unter isometrischen Bedingungen bei Normoxie und Hypoxie.

2.3.2 Inkubationsmedium

Das für die Vorinkubation und für die Versuche verwendete synthetische Seewasser hatte folgende Zusammmensetzung:

440 mM NaCl, 10 mM KCl, 11 mM $MgCl_2$, 8 mM $NaHCO_3$, 21 mM $MgSO_4$

Das Medium wurde durch einen Filter von 0.2 um Porengröße (Durapore, Millipore, Neu-Isenburg) filtriert. Der Muskel wurde mit 4 ml dieses Mediums mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min rezirkulierend beträufelt. Der Inkubationskreislauf wurde mit einer peristaltischen Pumpe (Deutsche Pharmacia, Freiburg) betrieben. Unmittelbar vor dem Einlauf in das Inkubationsgefäß wurde das Medium in einem Niveaugefäß mit dem entsprechenden Gas (s. 2.3.3) gesättigt. Für den unter 3.3.1 beschriebenen Versuch, der unter Luftbegasung durchgeführt wurde, wurde auf das Niveaugefäß verzichtet.

2.3.3 Begasung

Ein Bicarbonatgehalt des Mediums von 8 mM entspricht etwa den Werten, die von Pörtner (1982) in der Coelomflüssigkeit ruhender Tiere gemessen wurden. Bei dieser Bicarbonatkonzentration und einem pH-Wert des Mediums um pH 8 (Seewasser) wird jedoch bei Begasung mit Luft (0.03 % CO_2) nach

$$HCO_3^- + H^+ \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H_2O + CO_2$$

Kohlendioxid aus der Flüssigkeit ausgetrieben, bis sich ein Gleichgewicht zwischen dem pH, dem CO_2-Partialdruck der Luft und der Bicarbonatkonzentration des Mediums eingestellt hat. Nach Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_s + \log[H_2CO_3]/[HCO_3^-] \quad \text{bzw.}$$

$$pHCO_3^- = pCO_2 \cdot \alpha CO_2 \cdot 10^{pH-pK}$$

Dies führt zu einer erheblichen Alkalisierung des Mediums,

die auch durch zugesetzten Puffer nicht aufgefangen werden kann. Bei Begasung mit reinem N_2 (0% CO_2) kann diese Alkalisierung sogar zu einem Ausfallen von Calciumcarbonat nach

$$HCO_3^- + OH^- \rightleftharpoons CO_3^{2-} + H_2O \quad \text{und} \quad CO_3^{2-} + Ca^{2+} \rightleftharpoons CaCO_3$$

führen. Zur Begasung der Muskeln wurde daher ein Gemisch aus 0.1 % CO_2 und 99.9% Stickstoff bzw. Luft verwendet. Das Gasgemisch wurde aus CO_2 und Stickstoff bzw. Luft mit Hilfe zweier Gasmischpumpen hergestellt (Modell M 303/A - F, Wösthoff, Bochum). Die Luft wurde vor der Pumpe durch 1 N KOH und konz. H_2SO_4 geleitet und dadurch von CO_2 befreit und getrocknet. Der pH des Mediums stellte sich bei dieser Begasung auf 8.2 ein. Der gleiche pH wurde von Pörtner et al. (1986a) im Coelom ruhender S. nudus gemessen. Der Sauerstoffpartialdruck des Mediums bei Stickstoffbegasung wurde stichprobenartig mit einer O_2-Elektrode (Radiometer, Kopenhagen) im Durchfluß überprüft. Er lag am Ein- und Ausfluß des Versuchsgefäßes unter 5 Torr. Dieser Wert wurde etwa 20 min nach Einbringen des Muskels in das Versuchsgefäß (d.h. innerhalb der 20minütigen Ruhephase, s. 2.3.4) erreicht. Wegen des erheblichen Aufwands, der mit der Herstellung der Gasgemische verbunden ist, wurden alle anderen Versuche unter Begasung mit Luft bzw. N_2, ohne zugemischtes CO_2, durchgeführt. Um eine Alkalisierung zu vermeiden wurde der Bicarbonatgehalt des synthetischen Seewassers auf 2 mM gesenkt und dem Medium 5 mM HEPES pH 8.0 zugesetzt. Der pH stellte sich unter diesen Bedingungen zwischen 8.0 und 8.2 ein.

2.3.4 Versuchsdurchführung (s. auch Kreutzer, 1982)

Die Muskeln wurden wie unter 2.2 beschrieben präpariert und für 4-8 h mit Luft/CO_2 oder Luft (Versuch 3.3.1) begastem Inkubationsmedium vorinkubiert. Diese Vorinkubation sollte eine Adaptation an die Temperatur und das Medium ermöglichen und Unterschiede im Metabolitspiegel, die durch die Präparation oder die individuelle Vorgeschichte der Tiere bedingt

sind, weitgehend ausschalten. Die 50 - 100 mg schweren Muskeln wurden dann in das Inkubationsgefäß eingeklebt (s. 2.3.1) und unter ständiger Beträufelung vorsichtig auf eine Länge von 2 - 3.5 cm vorgedehnt. Die Dicke des Muskels betrug etwa 2 - 3 mm. Die obere Reizelektode wurde dann kurz unterhalb der Glasperle ca. 1 mm weit in den Muskel eingestochen. Nach 30 min wurde mit der Stimulation begonnen, die durch Rechteckimpulse mit einer Amplitude von 25 V, einer Breite von 1 ms und einer Frequenz von 0.1 Hz (6/min), erfolgte. Die Kraftamplitude der dadurch ausgelösten Einzelkontraktionen wurde auf einem Flachschreiber (Kipp & Zonen, BD 9) aufgezeichnet. Die Eichung des Schreibers erfolgte durch Anhängen von Gewichten an den Transducer. Von den vier Retraktoren eines Tieres wurden jeweils zwei unter Normoxie und zwei unter Hypoxie stimuliert.

Nach 10 - 60 minütige Kontraktionsphasen wurden die Muskeln von den Reizelektroden abgenommen, kurz auf Fließpapier abgetupft und mit Hilfe einer Gefrierzange sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Von Beendigung der Stimulation bis zum Einfrieren der Muskeln vergingen weniger als 10 Sekunden. Die Muskeln wurden bis zur Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Das Inkubationsmedium der jeweiligen Muskeln wurde bei -80^{o}C in der Tiefkühltruhe gelagert.

Für die Kontrollserie ("Ruhe 0 - 60 min") in Versuch 3.1.1 wurden die Muskeln in der oben beschriebenen Weise im Inkubationsgefäß angebracht, jedoch nicht stimuliert. Der Zeitpunkt t = 0 bezeichnet das Ende der 30 minütigen Vorinkubationsphase im Gefäß. Als Kontrolle für Versuch 3.3.1 dienten Muskeln, die in begastem Seewasser vorinkubiert waren.

2.3.5 Auswertung der Kraftaufzeichnung

Die Kraftamplituden der Einzelkontraktionen, die der Schreiber als Strichdiagramm registrierte, wurden vermessen. Um größenbedingte Unterschiede in der Kraftentwicklung der ein-

zelnen Retraktoren auszugleichen, wurde das Verhältnis der Kraftentwicklung zum Zeitpunkt t zur maximal entwickelten Kraft berechnet und nur für die maximale Amplitude die Absolutkraft bestimmt (s. Kreutzer, 1982).

2.4 Eingrabversuche

Die Versuche wurden von Herrn M. Körner im Rahmen seiner Staatsexamensarbeit (Körner, 1985) durchgeführt. Exemplare von S. nudus wurden in einem geschlossenen Behälter, der Sand und stickstoffbegastes Seewasser enthielt, eingesetzt und zu wiederholtem Eingraben veranlaßt. Körner registrierte neben der Zeit, die zu mehrmaligem Eingraben benötigt wurde, auch die Druckänderungen und den Sauerstoffpartialdruck im Coelom durch einen Katheter im Hinterende der Tiere. Nach verschiedenen Anzahlen von Grabzyklen wurden die Tiere präpariert und ihre Hautmuskelschläuche aufgearbeitet (s. Körner, 1985). Die separat eingefrorenen Retraktoren wurden von Herrn Körner nicht aufgearbeitet und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.5 Inkubation ruhender Muskeln unter hypoxen Bedingungen

Um eine langfristige Hypoxie zu erzeugen, wurden jeweils 3 Muskeln in 2 ml Inkubationsmedium in einer Warburg-Apparatur (Braun, Melsungen) inkubiert. Die Gefäße wurden unter langsamem Schütteln mit Stickstoff bzw. Luft durch den Kamin begast. Nach 30 min wurden Manometerhähne und Kamine der stickstoffbegasten Gefäße verschlossen, nach weiteren 2.5, 5 oder 7.5 h wurden die Muskeln den Gefäßen entnommen und sofort eingefroren. Luftbegaste Kontrollen wurden nach 7.5 h eingefroren. In Versuch 3.3.1 erfolgte die Inkubation von je 12 Muskeln in Rundkolben, die mit verschließbaren Begasungsaufsätzen versehen waren und je 50 ml Medium enthielten.

2.6 Extraktion der Metabolite

Die Metabolitextraktion der 50 - 100 mg schweren Muskeln wurde im Halbmikroverfahren nach Pette & Reichmann (1982) durchgeführt. Das Gewebe wurde in einem Halbmikromörser unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und in ein stickstoffgekühltes Eppendorfgefäß überführt. Das Gewebegewicht wurde durch Vor- und Nachwiegen des Gefäßes bestimmt. Alle weiteren Arbeitsgänge mit Ausnahme der Zentrifugationen erfolgten unter Kühlung in einem Eis-Salz-Gemisch. Für die Bestimmung des NADH-Gehalts (s. 2.7.3) wurden Muskeln in alkalischem Milieu extrahiert, da NADH bei saurem pH schnell oxidiert wird. Alle anderen Metabolite wurden in Perchlorsäureextrakten gemessen.

2.6.1 Perchlorsäureextrakte

Nach Zugabe der 5 - 6fachen Menge an 0.6 M Perchlorsäure wurde das Gewebepulver mit Hilfe eines Zahnarztbohrers (KaVo Technik, Leutkirch) 1 x 10 s und 2 x 5 s bei 15 000 U/min homogenisiert und anschließend 3 min in einer Eurohäma-Zentrifuge (Mod. 85-1, Runne, Heidelberg) bei 12 000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand nach Zugabe von 5 ul 0.1 % Phenolrot mit Hilfe einer Mikrolitерspritze mit 5 M KOH bis zum Umschlag des Indikators (pH 7 - 8) neutralisiert. Ausgefälltes Perchlorat wurde wie oben beschrieben abzentrifugiert, und der Überstand entweder direkt für die Metabolitbestimmungen eingesetzt oder in zwei Portionen bei -80°C eingefroren. In einigen Fällen wurden die Protein-Sedimente der ersten Zentrifugation in einem definierten Volumen an 1 N NaOH aufgelöst und der Proteingehalt nach Lowry et al. (1951) bestimmt.

2.6.2 NaOH-Extrakte (nach Lowry et al. 1961)

Das Gewebepulver wurde nach dem Zerkleinern in luftdicht verschließbare Gefrierröhrchen (Cryotube, 1.8 ml, Nunc-Inter

Med , Roskilde, Dänemark) überführt, dem Pulver wurde etwa das 8fache Volumen an 50 mM NaOH zugesetzt und wie unter 2.6.1 homogenisiert. Anschließend wurden die Extrakte für 20 min bei 60°C inkubiert, um NAD^+ vollständig zu zerstören. Die Extrakte wurden für 10 min bei 12 000 x g zentrifugiert und der Überstand direkt für die NADH-Bestimmung eingesetzt. Einige der Muskeln wurden in gefrorenem Zustand in zwei Hälften geteilt und die eine Hälfte mit Perchlorsäure, die andere Hälfte mit NaOH extrahiert.

2.6.3 Bestimmung des Extraktvolumens

Die Bestimmung des Extraktvolumens erfolgte rechnerisch. Zur Summe der zugegebenen Volumina wurden 80 % des Frischgewichts (s. Trockengewichtsbestimmung unter 3.3.2) als Wassergehalt des Gewebes addiert.

2.7 Quantitative Metabolitbestimmungen

2.7.1 Bestimmungen mit Hilfe des enzymatisch optischen Tests (Warburg & Christian, 1936)

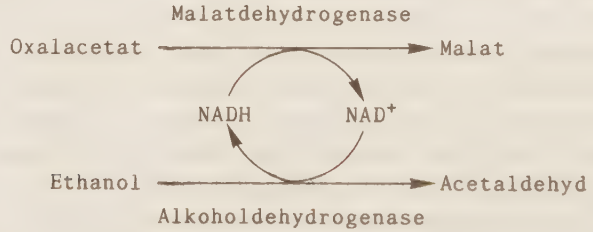
ATP wurde nach Lamprecht und Trauschold (1974), ADP und AMP nach Jaworek et al. (1974), L-Arginin und L-Phospho-Arginin nach Grieshaber et al. (1978), Pyruvat nach Czok & Lamprecht (1974), NAD^+ nach Klingenberg (1974) Malat nach Lowry & Passonneau (1972), L-Glycerin-3 Phosphat nach Michal & Lang (1974), Succinat nach Williamson (1974), L-Alanin nach Graßl (1974), L-Aspartat (in Versuch 3.3.4) nach Bergmeyer et al. (1974) und Octopin nach Grieshaber (1976) bestimmt. Der Reaktionsansatz für die enzymatische Alanopin- und Strombinbestimmung (Kalibrierung von HPLC-Standards und Substratlösungen) enthielt 100 mM Tris/HCl pH 8.5, 5 mM EDTA, 13 mM Hydrazin, 4 mM NAD^+ und 2 - 4 U/ml Alanopin/Strombindehydrogenase.

2.7.2 Säulenchromatographische Bestimmungen

Die Konzentration des Glycins, der Summe aus D- und L-Alanin, des L-Aspartats sowie der anderen freien Aminosäuren wurde nach Siegmund (1982) mit einem automatischen Aminosäureanalysator (Liquimat III, Dionex DC-6A Harz, Lithium-Citrat-Puffersystem; Kontron-Analytic, Eching) bestimmt. Die Bestimmung von Alanopin und Strombin in Gewebeextrakten erfolgte nach Siegmund & Grieshaber (1983) mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit einer Anlage der Firma Biotronik, Maintal (Kationenaustauscher Nr. 5311006/H, Leitfähigkeitsdetektion). Die Elution erfolgte isokratisch mit 7.5 x 10^{-5} N H_2SO_4. Enzymatisch synthetisiertes Alanopin und Strombin, das als Standard diente, wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. B. Siegmund zur Verfügung gestellt.

2.7.3 Bestimmung von NADH

Der NADH-Gehalt alkalischer Gewebeextrakte wurde nach Kato et al. (1973) mit enzymatischem "Cycling" (Lowry et al., 1961) bestimmt. Der Methode liegt folgender Reaktionszyklus zugrunde:



Bei NADH-Konzentrationen, die weit unter der Michaeliskonstante der beiden Enzyme liegen (Malatdehydrogenase: K_m(NADH) = 5 uM; Alkoholdehydrogenase: K_m(NAD^+) = 15 uM)), ist die Reaktionsgeschwindigkeit des Zyklus - und damit die gebildete Malatmenge - der NADH-Konzentration direkt proportional. Je nach Enzymkonzentration und Reaktionszeit kann die gebildete Malatmenge über das 10 000fache der eingesetzten NADH-Menge betragen. In der vorliegenden Untersuchung

wurden "Zyklusraten" zwischen 4 000 und 5 000 verwendet.

Der Reaktionsansatz enthielt 100 mM Tris, pH 8.0, 300 mM Ethanol, 2 mM Oxalacetat, 10 - 20 ug/ml Malatdehydrogenase (aus Schweineherz, Boehringer) und 50 - 100 ug/ml Alkoholdehydrogenase (aus Hefe, Boehringer). Die Bestimmung der NADH-Konzentration erfolgte mit Hilfe einer Eichgeraden. Dazu wurden jeweils 10 ul einer 20 - 200 nM NADH-Lösung (0.2 - 2 pmol; gelöst in 100 mM Na_2CO_3, 16 mM $NaHCO_3$, 10 mM NaOH), die aus einer 1mM photometrisch kalibrierten Stammlösung verdünnt wurde, in eisgekühlte Fluorometerröhrchen pipettiert. Nach Zugabe von 100 ul der Reaktionslösung wurden die Ansätze 1 h lang bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen mit Glaskugeln verschlossen und zum Abstoppen der Reaktion 4 min lang in ein Bad mit kochendem Wasser gestellt. Das gebildete Malat wurde anschließend in denselben Röhrchen fluorometrisch nach Lowry & Passonneau (1972) bestimmt. Zur Bestimmung der Konzentration in Gewebeextrakten wurden Verdünnungen des NaOH-Extraktes (s. 2.6.2) von 1:2.5 - 1:10 eingesetzt. Bei jeder Probenmessung wurde gleichzeitig eine Eichgerade erstellt.

Um Verunreinigungen der Enzymlösungen mit NADH, die ein großes Problem dieser empfindlichen Methode darstellen, möglichst quantitativ zu entfernen, wurden jeweils 200 ul einer Malatdehydrogenaselösung von 2 mg/ml und einer Alkoholdehydrogenaselösung von 5 mg/ml über Nacht in einer Gleichgewichtsdialyseapparatur (Typ Dianorm, Bachofer, Reutlingen) dialysiert. Jeweils eine der Halbkammern einer Dialysezelle wurde mit der Enzymlösung gefüllt, durch die andere Halbkammer wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml/min 20 mM Phosphatpuffer pH 7.0 gepumpt. Nach dieser Behandlung der Enzyme lag der Leerwert der Bestimmung unter 0.2 pMol/100 ul Reaktionslösung. Die Enzyme ließen sich, bei 4°C gelagert, mehrere Wochen lang verwenden.

Die Methode wurde in mehreren Versuchen überprüft:

1. Ein NADH-Standard wurde wie ein Extrakt behandelt. Im

"Cycling"-Ansatz konnten 90 - 95 % des NADH "wiedergefunden" werden.

2. Eine Hälfte eines Muskels wurde mit einer NaOH-Lösung extrahiert, die 5 uM NADH enthielt, während die andere ohne zugesetztes NADH extrahiert wurde. Abzüglich der NADH-Konzentration des Gewebes konnten beim NADH-Cycling 90% des zugesetzten NADH wiedergefunden werden.
3. Durch Ansäuern auf pH 2 konnten 85 % des im Extrakt gemessenen NADH abgebaut werden.
4. Der Fehler, der möglicherweise durch Malat aus dem Muskel selbst entsteht, liegt bei einem maximalen Malatgehalt von 400 nMol/g FG und einem NADH-Gehalt von mehr als 1 nMol/g FG bei einer Zyklusrate von 4000 nMol Malat/nMol NADH unter 4 000/400 = 10 %.
5. Da sich mit enzymatischem Cycling sowohl NADH als auch NAD^+ nachweisen läßt, wurde ebenfalls überprüft, ob das NAD^+ bei der Extraktbereitung vollständig zerstört wird. Eine 100 uM NAD^+-Lösung in 50 mM NaOH, die für 20 min auf 60°C erhitzt worden war, führte im NADH-Cycling zu Werten, die mit dem Leerwert identisch waren.
6. Die verwendete Alkoholdehydrogenase zeigte keine Aktivität mit NADP.

2.8 Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs

Der Sauerstoffverbrauch isolierter Retraktoren wurde manometrisch mit Hilfe einer Warburg-Apparatur bestimmt. Die ca. 15 ml fassenden Gefäße enthielten jeweils 8 Retraktoren bzw. ca. 1 g Hautmuskelschlauch (in Stücke von 0.5 x 3 cm geschnitten) in 3 ml synthetischem Seewasser oder 3 - 5 ml Coelomflüssigkeit, die ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt wurde. Alle Gefäße enthielten 500 ul 10 % KOH als CO_2 Absorbens. Ein leeres Gefäß diente zur Registrierung von Luftdruckschwankungen. Die Umrechnung der als Δ h abgelesenen Druckänderung in eine Volumenänderung unter Standardbedingungen (STPD) erfolgte nach Nachtigall, 1981. Die Werte für die einzelnen Gefäße wurden in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen, und der Sauerstoffverbrauch, anhand der

Steigung der resultierenden Geraden, in umol/g Gewebe · min ermittelt.

2.9 Bestimmung des intrazellulären pH

2.9.1 Experimentelle Bestimmung des pH_i

Der intrazelluläre pH-Wert isolierter Introvertretraktoren wurde nach Waddell & Butler (1959) modifiziert nach Heisler (1975), Heisler et al. (1976), bestimmt. Die Methode beruht auf der Verteilung der ^{14}C-markierten schwachen Säure 5,5-Dimethyloxazolidin-2,4-dion (DMO) zwischen Intra- und Extrazellulärraum. DMO kann die Zellmembran in undissoziiertem Zustand 1000 mal besser permeieren als in dissoziiertem Zustand (Keifer & Roos, 1981). Daher geht man davon aus, daß die undissoziierte Form bei Erreichen eines Gleichgewichtszustandes in beiden Kompartimenten gleich verteilt ist. Die Menge an nicht permeierender, dissoziierter Form der Säure richtet sich dagegen nach dem pH-Wert in dem jeweiligen Kompartiment. Kennt man die ^{14}C-Markierung und den pH-Wert des Extrazellulärraumes, der in diesem Fall dem umgebenden Medium gleichgesetzt wird, so läßt sich, aus der ^{14}C-Markierung des Gewebes und dem anteiligen Volumen des Extrazellulärraumes der intrazelluläre pH berechnen. Die Bestimmung des anteiligen Volumens Q des Extrazellulärraumes erfolgt mit Hilfe ^{3}H-markierten Inulins:

$$Q = {}^{3}H \text{ (Muskelwasser)} : {}^{3}H \text{ (Medium)}$$

Die oben genannten Zusammenhänge gelten allerdings nur unter der Voraussetzung, daß DMO bzw. Inulin gleichmäßig im Gewebe verteilt sind.

Die isolierten Introvertretraktoren wurden auf spezielle Spannbrettchen geklebt, auf 3 cm vorgedehnt und 3 h in belüftetem synthetischen Seewasser vorinkubiert. Dann wurden sie für 5 bis 180 min in belüftetem synthetischen Seewasser inkubiert dem 0.125 uCi/ml ^{14}C-DMO und 0.100 uCi/ml ^{3}H-

Inulin zugesetzt war. In einer anderen Versuchsserie wurden die Muskeln, wie unter 3.1 beschrieben, in das Versuchsgefäß eingeklebt und für 5 bis 30 min mit dem radioaktiven Medium beträufelt. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Muskeln auf Fließpapier abgetupft und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Jeweils nach der Entnahme der Muskeln wurde mit einer kapillaren Glaselektrode (PHM 84, BMS II, Radiometer, Kopenhagen) der pH des Mediums gemessen, sowie ein Aliquot für die Bestimmung der extrazellulären Markierung eingefroren. Die weitere Aufarbeitung der Proben und die Berechnungen erfolgten wie von Pörtner (1982) beschrieben.

2.9.2 Näherungsrechnung zur Bestimmung des pH_i

Zur Berechnung der Veränderungen des intrazellulären pH, gegenüber dem Kontrollwert in kontrahierenden Muskeln, wurde eine Näherungsrechnung nach Pörtner (1987) durchgeführt. Anhand der Akkumulation der anaeroben Endprodukte werden bei diesem Verfahren zunächst die metabolisch gebildeten Protonen (s. Pörtner et al., 1984b) summiert. Unter Berücksichtigung des Bicarbonat- und des Nicht-Bicabonat-Pufferwertes des Gewebes sowie unter der Annahme, daß keine Protonen in das Medium abgegeben oder aus dem Medium aufgenommen werden, läßt sich daraus die Änderung der Protonenkonzentration (bzw. der pH-Wert) berechnen. Da der Phospho-L-Arginin Gehalt starken Individualschwankungen unterliegt, wird der Wert um den Faktor

$$\frac{\text{Mittelwert } \Sigma\,(\text{PLA} + \text{L-Arg} + \text{Oct}) \text{ aller Versuchsmuskeln}}{\text{Mittelwert } \Sigma\,(\text{PLA} + \text{L-Arg} + \text{Oct}) \text{ zum Zeitpunkt t}}$$

korrigiert. Intrazelluläre Konzentrationen lassen sich anhand der Fraktion des Zellwassers berechnen, die sich aus der Differenz zwischen Gesamt-Muskelwasser F_m und der Fraktion des Extrazellulärraumes Q ergibt.

Die metabolisch gebildeten Protonen wurden anhand der Mittelwerte der Phospho-L-Arginin-, Octopin-, Strombin-, Pyru-

vat-, Succinat-, Malat- und Glycerin-3-Phosphatgehalte aus Versuch 3.3.1 sowie der Mittelwerte der ATP-Gehalte aus Versuch 3.3.1 berechnet. Für F_m und Q wurden die bei der experimentellen Bestimmung des intrazellulären pH (s. 3.3.2) ermittelten Werte eingesetzt. Ferner wurde ein konstanter CO_2-Partialdruck von 0.5 Torr und ein Nicht-Bicarbonatpufferwert von 33 mmol/pH·l Zellwasser (Pörtner et al., 1984c) zugrunde gelegt.

2.10 Untersuchung der Opindehydrogenasen

2.10.1 Aktivitätstest

Die Aktivitätsbestimmung wurde nach Fields (1976) durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 100 mM Imidazol/HCl pH 7.0, 10 mM Pyruvat, 0.25 mM NADH, 5 mM L-Arginin (Octopindehydrogenase) oder 200 mM L-Alanin bzw. Glycin (Alanopin- bzw. Strombindehydrogenase).

2.10.2 Proteinbestimmung

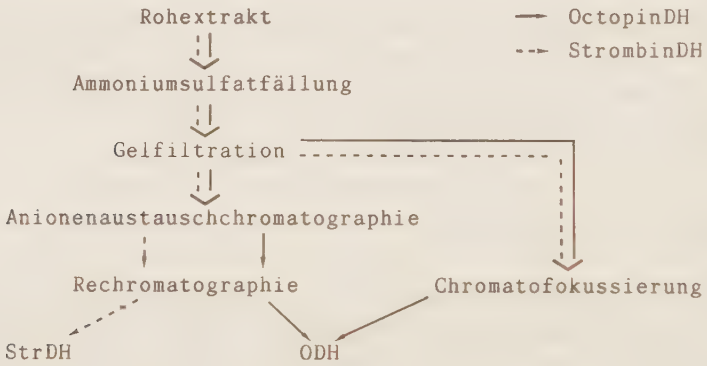
Der Proteingehalt der Rohextrakte sowie der Enzymextrakte nach den einzelnen Reinigungsschritten wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Gamma-Globulin diente als Proteinstandard. Veränderungen des Proteingehalts im Eluat der Chromatographie-Säulen wurden durch Messung der Extinktion bei 280 nm kontinuierlich registriert.

2.10.3 Bestimmung der Opindehydrogenaseaktivität in Rohextrakten

Die Tiere wurden wie unter 2. beschrieben präpariert. Der Hautmuskelschlauch der aus einer inneren Längsmuskelschicht und einer äußeren Schicht besteht, welche Ringmuskulatur, Cutis und Cuticula umfaßt, wurden auf dem Präparierbrett festgesteckt. Durch leichtes Schaben mit einem Skalpell

lassen sich die beiden Schichten mühelos voneinander trennen (Pörtner, 1982). Retraktoren, Längs- und Ringmuskelschicht wurden getrennt in dem 5fachen Volumen an eiskaltem Puffer (50 mM TRA/NaOH pH 7.4, 1 mM EDTA, 30 mM Mercaptoethanol) 3 x 20 s mit einem Ultraturraxhomogenisator (Janke & Kunkel, Staufen) homogenisiert und für 30 min bei 30 000 x g zentrifugiert. Je 1 ml des Überstandes wurde über Gelfiltrationssäulen (Sephadex-G-25, PD-10, Pharmacia), die mit Homogenisationspuffer äquilibriert waren von niedermolekularen Bestandteilen befreit und auf Opindehydrogenaseaktivität getestet.

2.10.4 Reinigungsschema



Wenn nicht anders angegeben, erfolgten alle Reinigungschritte bei 4°C.

2.10.5 Rohextrakt

Gefrorene Hautmuskelschläuche wurden unter flüssigem Stickstoff zermörsert, das Gewebepulver in dem 6 - 8fachen Volumen an Homogenisationspuffer (100 mM TRA/NaOH pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) aufgetaut, 3 x 1 min mit Hilfe eines Omnimix-Homogenisators (Sorvall, Newtown, USA) unter Eiskühlung homogenisiert und 1 h bei 20 000 x g zentrifugiert.

2.10.6 Ammoniumsulfatfällung

Es wurde eine fraktionierte Fällung von 0 - 45 % Sättigung und von 45 - 75 % Sättigung durchgeführt. Nach den Fällungsschritten wurde der Extrakt jeweils 1 h lang bei 20 000 x g zentrifugiert. Das Sediment der zweiten Fällung wurde in einem möglichst geringen Volumen an Phosphatpuffer (50 mM K-Phosphat, pH 7.5, 1 mM EDTA, 10 mM Mercaptoethanol, 10 % Glycerin) aufgenommen und über Nacht gegen das 100fache Volumen des gleichen Puffers dialysiert.

2.10.7 Gelfiltration

Die Gelfiltration erfolgte mittels Sephadex-G-100 (Pharmacia, Gelbett 7.5 x 125 cm, Fließgeschwindigkeit 90 ml/h) oder mittels Superose 6B Prep Grade (Gelbett 1.5 x 60 cm, Fließgeschwindigkeit 0.3 ml/min), die mit Hilfe des FPLC-Systems (Pharmacia) betrieben wurde. Auf die G-100-Säule wurden bis zu 1.3 g in 25 ml auf die Superose-Säule bis zu 200 mg Protein in 3 ml aufgetragen. Nach der Gelfitration wurden die Fraktionen mit mehr als 20 % der Maximalaktivität mit einer Druckfiltrationszelle (Amicon, Witten, Membran PM 10) eingeengt und über Sephadex G-25 (PD 10 s.o.) in 20 mM Imidazol/HCl pH 7.0, 10 % Glycerin filtriert.

2.10.8 Anionenaustauschchromatographie

Für die Anionenaustauschchromatographie wurde eine konventionelle Säule mit DEAE-Sephacel (Pharmacia, Gelbett 2.5 x 25 cm, Fließgeschwindigkeit 20 ml/min, Puffer 20 mM Imidazol/HCl pH 7.0, 10 % Glycerin, Waschen mit 25 ml, Elution mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 - 200 mM in 340 ml) oder eine Mono Q-Säule (Pharmacia) verwendet, die mit dem FPLC-System betrieben wurde. Analytische Trennungen wurden mit einer Mono Q-Säule 0.5 x 50 mm, präparative Trennungen mit einer Mono Q-Säule 10 x 100 mm durchgeführt. Die Säulen wurden mit 20 mM Imidazol/HCl pH 7.0, 10 % Glycerin (A-

Puffer) äquilibriert und gewaschen und mit einem NaCl-Gradienten von 0 - 100 mM NaCl eluiert (B-Puffer: 20 mM Imidazol/HCl, pH 7.0, 10 % Glycerin, 200 mM NaCl, Einzelheiten s. Abbildungen). Die Trennungen wurden auf der analytischen Säule bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min optimiert. Zur Übertragung der Bedingungen auf die präparative Säule wurden die Fließgeschwindigkeit und das Gradientenvolumen mit dem Faktor 4 multipiziert. Auf der präparativen Säule lassen sich so fast identische Trennungen erhalten. Abbildung 8 zeigt dies am Beispiel einer Opindehydrogenasepräparation aus Crassostrea angulata. Die DEAE-Säule wurde mit 90 mg, die präparative Mono Q-Säule mit 5 - 20 mg Protein beladen. Die beiden Peaks mit der höchsten Octopin- bzw. Strombindehydrogenaseaktivität wurden getrennt vereinigt und durch Druckfiltration eingeengt.

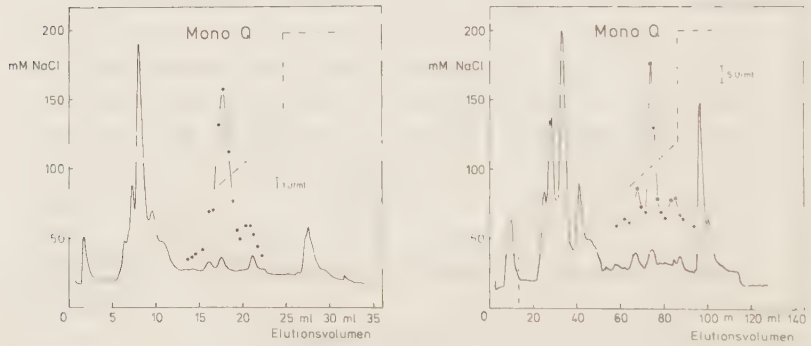


Abbildung 8: FPLC-Anionenaustauschchromatographie der Alanopin/Strombindehydrogenase der Auster Crassostrea angulata. Säule: Mono Q; Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7.5; Probe: Adduktor nach Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltration; Proteingehalt: 1.2 mg/ml; Aktivität: 120 U/ml.
links: analytischer Lauf, Säule: Mono Q, 5 x 50 mm; Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min; Probevolumen: 0.2 ml.
rechts: präparativer Lauf, Säule: Mono Q, 10 x 100 mm; Fließgeschwindigkeit: 4 ml/min; Probevolumen: 3.2 ml.

2.10.9 Rechromatographie über Mono Q

Die vereinigten Fraktionen der Octopin- und der Strombindehydrogenase wurden entweder über G-25 entsalzt, oder 1:4 verdünnt und - unter den gleichen Bedingungen wie unter 2.10.8 beschrieben - einzeln nochmals auf die präparative Mono Q-Säule aufgetragen und mit einem Gradienten von 0 - 60 mM (ODH) bzw. 20 - 60 mM (StrDH) eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden vereinigt, eingeengt und entsalzt und mit der Hälfte des Volumens an Glycerin versetzt. Bei -20°C läßt sich die Octopindehydrogenase für einige Monate, die Strombindehydrogenase etwa 2 Wochen lang, ohne Aktivitätsverlust aufbewahren.

2.10.10 Reinigung von FPLC-Säulen

Extrakte aus dem Hautmuskelschlauch von S. nudus verursachen auf Mono Q-Säulen in manchen Fällen eine starke Erhöhung des Drucks. Diese ist möglicherweise auf Glykogen zurückzuführen, das einige Prozent des Trockengewichts der Muskeln ausmacht und auch durch Gelfiltration wahrscheinlich nicht vollständig abgetrennt wird. Bei rechtzeitiger Behandlung der Säule mit 1N NaOH und 75 % Essigsäure ließ sich eine Verringerung des Drucks erzielen, wobei ein bloßes Durchpumpen von Säure oder Lauge sehr viel weniger effektvoll war, als eine Inkubation der Säule über Nacht. Bei fortgeschrittener "Verschmutzung" der Säule bewirkten diese Maßnahmen manchmal eher eine Verschlechterung und nur ein Auswechseln der oberen und unteren Filter sowie ein Aufrühren des Harzes schafften Abhilfe. In Ausnahmefällen war es auch möglich, das Harz aus der Säule herauszupumpen, über Nacht mit 1 N NaOH zu regenerieren und dann die Säule portionsweise neu zu packen. Der in Abbildung 8 links gezeigte Lauf wurde mit einer so behandelten Säule durchgeführt, die trotz der unvermeidlichen Verluste an Harzmaterial noch gute Trennergebnisse lieferte.

2.10.11 Chromatofokussierung

Mit einem durch Gelfiltration vorgereinigten Extrakt wurde eine Chromatofokussierung durchgeführt. 1 ml Probe (2.1 mg Protein/ml in 25 mM Tris/HCl pH 6.3) wurde auf eine Mono P Säule aufgetragen, die mit dem FPLC-System betrieben wurde und mit 25 mM Tris/HCl pH 6.3 äquilibriert war. Nach dem Einspritzen der Probe wurden 40 ml 10 % Polypuffer 74 /HCl pH 4.0 über die Säule gepumpt (Fließgeschwindigkeit 0.7 ml/min). Der pH-Wert der Fraktionen wurde mit einer kapillaren Glaselektrode (BMS II, PHM 84, Radiometer, Kopenhagen) gemessen.

2.10.12 Elektophoresen

Native, diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophoresen wurden routinemäßig nach Maurer (1968; Gelsystem Nr.1) in Gelröhrchen mit einer Elektophoreseapparatur der Firma Pharmacia durchgeführt. Das Trenngel enthielt 7.7 % Acrylamid, das Sammelgel 4.7 %, die Stromstärke betrug 2.5 mA pro Röhrchen. Die Gelstäbchen wurden mit 50 % Trichloressigsäure, 0.1 % Coomassieblau 1h lang fixiert und gefärbt und in 7 % Essigsäure entfärbt und aufbewahrt. Die spezifische Anfärbung der Enzymaktivität erfolgte nach Latner & Skillen (1968) in einer Lösung von 50 mM Tris/HCl pH 8.1, 0.5 mM Nitroblauterazoliumchlorid, 0.1 mM Phenazinmetasulfat, 1.5 mM NAD^+ und 2 mM Octopin bzw. 10 mM Strombin bzw. 10 mM Alanopin. Nach Anfärbung der Aktivitätsbanden wurden die Gele in 7 % Essigsäure fixiert.

Zur elektrophoretischen Trennung von Rohextrakten und gereinigter Octopindehydrogenase wurde ein Phast-Elektophoresesystem (Pharmacia) benutzt. Die native diskontinuierliche Polyacrylamidgradientengelelektrophorese wurde mit einem vorgefertigten Gel (Pharmacia) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, das gleiche gilt für die isoelektrische Fokussierung der gereinigten Octopindehydrogenase (pH-Gradient 3 - 7). Die Aktivitätsanfärbung erfolgte in der

oben angegebenen Weise.

Präparative Elektrophoresen wurden mit einem Gerät der Firma BRL (Neu-Isenburg) durchgeführt. Gele und Elektophoresepuffer entsprachen denen für die analytische Gelelektrophorese (s.o.). Die Stromstärke betrug 5 mA. Der Elutionspuffer (100 mM Tris/HCl, 10 % Glycerin, pH 7.5) wurde mit einer Geschwindigkeit von 7.5 ml/h mit einer peristaltischen Pumpe gepumpt.

2.10.13 Bestimmung des Molekulargewichts

Das Molekulargewicht der Opindehydrogenasen wurde an einer durch Ammoniumsulfatfällung vorgereinigten Fraktion, sowie an den gereinigten Enzymen mittels Gelfiltration über Sephadex G-75 (Pharmacia, Gelbett 2.5 x 88 cm; Puffer: 50 mM K-Phosphat pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT; Fließgeschwindigkeit 10 ml/h) bestimmt. Die Säule wurde mit Aldolase (M_{rel} 158 000), Rinderserumalbumin (68 000), Eialbumin (45 000), Chymotrypsinogen A (25 000) und Cytochrom C (12 500) geeicht. Die Auswertung erfolgte anhand der K_{av}-Werte.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_x}$$

V_e = Elutionsvolumen des Aktivitätsmaximums
V_0 = Ausschlußvolumen
V_x = Gelvolumen (= Gelbettvolumen - V_0)

2.10.14 Bestimmung der Substrataffinitäten

Die apparenten Michaeliskonstanten (K_{app}) für die einzelnen Substrate wurden anhand von Lineweaver-Burk-Diagrammen nach der Gleichung:

$$1/v = K_{app}/[S] + 1/V$$

v = Reaktionsgeschwindigkeit
V = Maximalgeschwindigkeit
[S] = Substratkonzentration

berechnet.

2.10.15 Extrapolierung der physiologischen Enzymaktivitäten

a) Octopindehydrogenase

Die absoluten K_m-Werte der Octopindehydrogenase bei sättigenden NADH-Konzentrationen wurden nach Price & Stevens (1982) aus Sekundärdiagrammen ermittelt. Die Geschwindigkeitsgleichung für einen Ternär-Komplex-Mechanismus, der für die Octopindehydrogenase nachgewiesen wurde (Doublet & Olomucki, 1975), lautet:

$$v = \frac{V_{AP} \cdot [A] \cdot [P]}{K_{iA} \cdot K_P + K_A \cdot [P] + K_P \cdot [A] + [A] \cdot [P]}$$

V_{AP} = absolute Maximalgeschwindigkeit (588 U/mg Protein)
[A] = Argininkonzentration
[P] = Pyruvatkonzentration
K_{iA} = Dissoziationskomstante des Arginins (11.7 mM)
K_P = absoluter K_m-Wert für Pyruvat (0.6 mM)
K_A = absoluter K_m-Wert für Arginin (1.9 mM)

Zunächst wurden die Geschwindigkeiten bei den entspechenden Pyruvat und Argininkonzentrationen bestimmt und durch die Geschwindigkeit mit 10 mM Pyruvat und 5 mM Arginin (Konzentration im Testansatz bei den Enzymmessungen) dividiert. Die im Rohextrakt bestimmte Maximalaktivität wurde mit diesem Wert multipliziert. Die Umrechnung der bei 25°C gemessenen Aktivität auf die Versuchstemperatur erfolgte unter Annahme eines Q_{10} von 2.

b) Strombindehydrogenase

Die Aktivitäten bei den enspechenden Pyruvatkonzentrationen wurden zunächst nach der Gleichung:

$$1/v = K_{mP}/V \cdot 1/[P] + 1/V$$

K_{mP} = apparente Michaeliskonstante für Pyruvat (1.2 mM)
V = Maximalgeschwindigkeit (122.7 U/mg Protein)

berechnet, da die absoluten K_m-Werte für die Strombindehydrogenase nicht bestimmt wurden. Die weitere Berechnung erfolgte wie für die Octopindehydrogenase beschrieben. Da Glycin auch unter physiologischen Bedingungen sättigend vorhanden ist, dürften die Werte, auch wenn sie mit den apparenten Konstanten berechnet sind, etwa den physiologischen Gegebenheiten entsprechen.

2.11 Bestimmung der apparenten Gleichgewichtskonstanten der Octopin- und der Strombindehydrogenasereaktion

Die apparenten Gleichgewichtskonstanten der Octopin- und der Strombindehydrogenasereaktion wurden mit gereinigter Octopindehydrogenase aus S. nudus bzw. gereinigter Strombin/Alanopindehydrogenase aus C. angulata bestimmt. In 100 mM Imidazolpuffer pH 7.4 wurde bei verschiedenen Konzentrationen an NAD^+ (0.5 - 2 mM) und Octopin bzw. Strombin (0.5 - 2.5 mM) die NADH-Konzentration nach der Einstellung des Gleichgewichts photometrisch bei 339 nm bestimmt. Da Pyruvat und die entsprechende Aminosäure in äquimolaren Mengen gebildet werden (Gleichung 1), läßt sich anhand der vorgegebenen Metabolitkonzentrationen, der Konzentration an NADH (Gl. 2 bis 4) und des pH-Wertes die apparente Gleichgewichtskonstante abschätzen (Gl. 5).

Nach Einstellung des Gleichgewichts gilt:

$$[\text{Pyruvat}] = [\text{Aminosäure}] = [\text{NADH}] \qquad (1)$$

$$\Longrightarrow [\text{Pyruvat}] \cdot [\text{Aminosäure}] \cdot [\text{NADH}] = [\text{NADH}]^3 \qquad (2)$$

$$[\text{Opin}] = [\text{Opin}]_{\text{vorgegeben}} - [\text{NADH}] \qquad (3)$$

$$[\text{NAD}^+] = [\text{NAD}^+]_{\text{vorgegeben}} - [\text{NADH}] \qquad (4)$$

$$\Longrightarrow K'_{app} = \frac{[\text{NADH}]^3 \times 10^{-pH}}{([\text{Opin}]_v - [\text{NADH}]) \times ([\text{NAD}^+]_v - [\text{NADH}])} \qquad (5)$$

2.12 Chemikalien

2.12.1 Käufliche Chemikalien

Es wurden Chemikalien mit höchstmöglicher Reinheit verwendet. Enzyme und Feinbiochemika lieferten die Firmen Boehringer Mannheim und Sigma St. Louis. Weitere Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Fluka (Neu-Ulm), Gase (N_2 > 99.999 %, CO_2 > 99.995 %, O_2 > 99.999 %) von der Firma Messer-Griesheim (Dortmund) geliefert. ^{14}C-DMO und ^{3}H-Inulin wurden von Amersham Buchler, Braunschweig, CO_2-Absorbens Carbosorb und Szintillationsflüssigkeiten Monophase 40 und Permafluor 5 wurden von der Firma Packard, Illinois, USA bezogen.

2.12.2 Octopin- und Alanopin/Strombindehydrogenase

Die für die Bestimmung von L-Arginin, Phospho-L-Arginin und Octopin verwendete Octopindehydrogenase wurde nach Gäde & Carlsson (1984) aus dem Schließmuskel der Jacobsmuschel Pecten maximus gereinigt. Alanopin/Strombindehydrogenase, die für die Kalibrierung von Alanopin- und Strombinlösungen sowie zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten (s. 2.11) Verwendung fand, wurde nach Siegmund & Grieshaber (1983) aus dem Schließmuskel der Auster Crassostrea angulata gereinigt (s. auch Abbildung 8). Die Gelfiltration mittels Sephadex G-100 wurde dabei durch eine Gelfiltration mittels Superose 6B Prep Grade mit Hilfe des FPLC-Systems (Deutsche Pharmacia, Freiburg) ersetzt, was die Reinigungsprozedur erheblich verkürzt. Innerhalb von zwei Tagen können auf diese Weise aus 20 g Schließmuskel 200 U Alanopin/Strombindehydrogenase mit einer spezifischen Aktivität von etwa 300 U/mg Protein gewonnen werden.

2.12.3 Alanopin und Strombin

Die Substanzen, die als Substrat für die Alanopin- und Strombindehydrogenase benötigt wurden, sind bisher noch nicht im Handel erhältlich und mußten daher aus käuflichen Vorstufen synthetisiert werden. Eine enzymatische Alanopin- und Strombinsynthese, wie sie von De Zwaan & Zurburg (1981) beschrieben wurde, erwies sich für eine Produktion im Millimol-Bereich als zu langwierig und teuer, da ein Mol NADH pro Mol Alanopin und Strombin, sowie große Mengen an Austernenzym benötigt werden. Strombin und Alanopin wurden deshalb chemisch aus D-Alanin und Glyoxylsäure bzw. Pyruvat mit Hilfe des Reduktionsmittels Natriumcyanoborohydrid synthetisiert (nach Borch et al., 1971; Mommsen pers. Mitteilung).

Der Reaktionsansatz enthielt: 85 mMol D-Alanin und 215 mMol Glyoxylat (Strombinsynthese) bzw. Pyruvat (Alanopinsynthese) in 150 ml H_2O, pH 6.5 - 7. Innerhalb von 30 min wurden unter Rühren 95 mMol Natriumcyanoborohydrid zugegeben. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 4 N HCl bei 6.5 - 7, die Temperatur durch Kühlung zwischen 15 und 20°C, gehalten. Nach weiteren 60 min wurde der Reaktionsansatz bei 25°C mit Salzsäure auf pH 1.5 gebracht und über Nacht bei 10°C weiter gerührt. Am nächsten Morgen wurde der Ansatz an der Wasserstrahlpumpe entgast, um die bei der Reaktion entstehende Blausäure möglichst quantitativ zu entfernen.

Die Reinigung des synthetisierten Alanopin und Strombin von nicht umgesetztem D-Alanin und 2-Oxosäuren erfolgte nach Tempe (pers. Mitteilung; Tempe, 1983). 100 ml des Reaktionsansatzes (pH 1.5) wurden auf einen Kationentauscher AG 50 W - X 8, 20 - 50 mesh (Bio Rad, München), H^+-Form, Bettvolumen 25 x 430 mm, gegeben. Die Säule wurde mit 600 ml 0.1 N HCl und 600 ml H_2O gewaschen und mit 3.5 l 150 mM NH_4OH eluiert. Der pH und die Opinkonzentration des Eluats wurden kontinuierlich verfolgt (s. Abbildung 9).

Der pH stieg zunächst auf einen Wert von etwa 3 und nach einem Elutionsvolumen von 4.5 l innerhalb von 100 ml auf

etwa pH 10. Schon mit 0.1 N HCl wurden 5 % des Strombins bzw. 45 % des Alanopins eluiert, ein nochmaliges Auftragen veränderte diesen Prozentsatz nicht nenneswert. Der größte Teil der an die Säule gebundenen Substanz eluierte vor dem Anstieg des pH-Wertes auf 10. Die Fraktionen mit einem pH-Wert zwischen 3 und 4 und einer Konzentration von mehr als 5 % der maximalen Konzentration wurden vereinigt und im Rotavapor zur Trockene eingeengt. Die Präparation wurde in einem geringen Volumen an H_2O gelöst, zweimal mit Aktivkohle behandelt und in wäßrigem Ethanol kristallisiert. Während Alanopin bei dieser Prozedur weiße Kristalle ergab, separierte Strombin als Sirup, der erst durch Gefriertrocknen fest wurde. Das gleiche Phänomen wurde auch von Mommsen beobachtet (pers. Mitteilung).

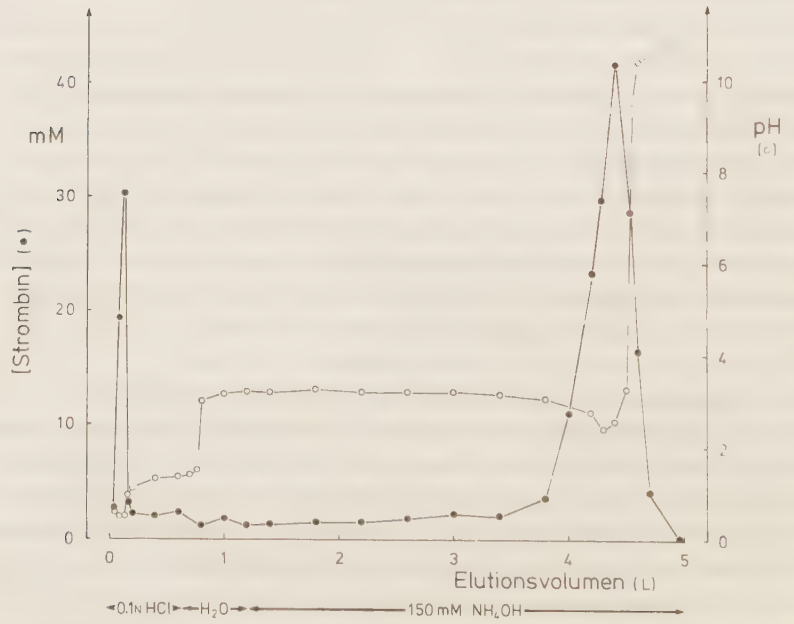


Abbildung 9: Elutionsdiagramm der Kationenaustauschchromatographie chemisch sythetisierten Strombins. HPLC-chromatographisch bestimmte Strombinkonzentration und pH-Wert des Eluats.

Eine HPLC-chromatographische Überprüfung der Substanzen anhand eines enzymatisch synthetisierten Standards, der mir freundlicherweise von Herrn Dr. B. Siegmund zur Verfügung gestellt wurde, ergab für das chemisch synthetisierte Strombin einen Gehalt von 66%. In einer Probe kristallinen Strombins, die ich von Herrn Dr. J. Fields (San Diego) erhielt, konnten enzymatisch ebenfalls 70 % Strombin nachgewiesen werden. Für chemisch synthetisiertes Alanopin ergab sich bei der HPLC-Bestimmung ein Gehalt von 97 %. Beide Substanzen ließen im Leitfähigkeitssignal keine Verunreinigungen erkennen. Eine enzymatische Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des Austernenzyms ergab für Strombin, wie bei der HPLC-Bestimmung, einen Gehalt von 67 %, für Alanopin jedoch von nur 42 %. Nach Mommsen (pers. Mitteilung) ergibt die chemische Alanopin-Synthese ein Racemat aus D- und meso-Alanopin. Nur letzteres wird von den Opindehydrogenasen umgesetzt, eluiert bei der HPLC-Bestimmung jedoch wie das D-Isomere. Lediglich auf Säulen mit sehr guten Trenneigenschaften konnte ein zweigipfeliger Alanopin-Peak beobachtet werden. Die Konzentrationsangaben im Methoden- und Ergebnisteil beziehen sich immer auf das biologisch aktive meso-Isomer. Sowohl das chemisch synthetisierte Alanopin als auch das Strombin wiesen in kinetischen Untersuchungen der Rückreaktion der Alanopin/Strombindehydrogenase von S. nudus (s. 3.2.3) keine hemmenden Eigenschaften auf, die gleiche Beobachtung machte auch Meinardus-Hager bei der Untersuchung der Rückreaktion der Alanopin/Strombindehydrogenase von Cardium tuberculatum (pers. Mitteilung).

2.13 Geräte

Die enzymatischen Metabolitbestimmungen wurden an Uvikon (710, 810) Spektralphotometern (Kontron, Eching) sowie an Farrand Fluorometern (Kontron) und an einem Sigma ZWS 11 Zweiwellenlängenphotometer (Sigma Instrumente, Berlin), Enzymaktivitätsbestimmungen wurden an einem Shimadzu Photometer (UV-1, Kontron) durchgeführt. Die Verbrennung radioaktiv markierter Proben unter reinem Sauerstoff erfolgte in einem

Verbrenner (Oxidizer 306) der Firma Packard, Illinois, USA, die Radioaktivitätsmessung mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationszählers (LS 1801) der Firma Beckman (München).

2.14 Berechnung der ATP-, ADP- und AMP-Gehalte anhand des Myokinase- und des Argininkinasegleichgewichtes.

Mit Hilfe der Gleichgewichtskonstanten der Arginin- und der Myokinasereaktion lassen sich für ein bestimmtes Verhältnis von Arginin zu Argininphosphat und eine bestimmte Summe der Adenylate die Konzentrationen von ATP, ADP und AMP berechnen, die bei Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes erreicht werden.

Die Gleichung der Argininkinasereaktion lautet:

$$K'_{AK} = \frac{[Arg] \cdot [ATP]}{[PLA] \cdot [ADP] \cdot [H^+]} \quad \text{für einen bestimmten pH:}$$

$$K_{AK} = \frac{[Arg] \cdot [ATP]}{[PLA] \cdot [ADP]} \qquad (1)$$

K_{AK} = 53.74 bei pH 7.1 (Graham et al., 1986)
K_{AK} = 30.23 bei pH 7.35

Die Gleichung der Myokinasereaktion lautet:

$$K_{MK} = \frac{[ATP] \cdot [AMP]}{[ADP]^2} \qquad (2)$$

K_{MK} = 1.12 (1 mM Mg^{2+}; Veech, 1978)

Die Summe der Adenylate (c_A) ist konstant:

$$c_A = [ATP] + [ADP] + [AMP] \qquad (3)$$

Anhand der folgenden Umformungen läßt sich eine Formel (Gleichung 6) ableiten mit der Myokinase- und Argininkinase-gleichgewicht miteinander verknüpft werden können:

Gleichung (1) und (2) lassen sich nach ATP auflösen und gleichsetzen:

$$[ATP] = \frac{K_{AK} \cdot [ADP] \cdot [PLA]}{[Arg]} \qquad (1a)$$

$$[ATP] = \frac{K_{MK} \cdot [ADP]^2}{[AMP]} \qquad (2a)$$

Gl. (1a) mit Gl. (2a) gleichgesetzt und nach ADP aufgelöst:

$$[ADP] = \frac{K_{AK} \cdot [PLA] \cdot [AMP]}{K_{MK} \cdot [Arg]} \qquad (4)$$

Gl. (1) und (2) nach [ADP] aufgelöst, gleichgesetzt und nach ATP aufgelöst:

$$[ATP] = \frac{[AMP] \cdot [PLA]^2 \cdot K_{AK}^2}{[Arg]^2 \cdot K_{MK}} \qquad (5)$$

Gl. (4) und (5) in Gl.(3) eingesetzt:

$$[AMP] = \left(\frac{K_{AK}}{K_{MK}} \cdot \frac{[PLA]}{[Arg]} + \frac{[PLA]^2}{[Arg]^2} \cdot \frac{K_{AK}^2}{K_{MK}} + 1\right)^{-1} \cdot c_A \qquad (6)$$

Durch Einsetzen der Werte für das Argininphosphat/Arginin-verhältnis ([PLA]/[Arg]) und die Adenylatkonzentration (c_A) in Gleichung (6) läßt sich der AMP-Gehalt berechnen. Der Wert kann dann in Gleichung (4) zur Berechnung des ADP-Gehalts eingesetzt werden. Der ATP-Gehalt ergibt sich aus Gleichung (3).

3. ERGEBNISSE

3.1 Der Introvertretraktor
- Biotopbedingte[1] und funktionsbedingte Anaerobiose -

Dieser erste Versuchskomplex sollte zunächst dazu dienen, die beiden Situationen der funktionsbedingten und der biotopbedingten Anaerobiose am Modell des isolierten Introvertretraktors vergleichend zu charakterisieren. Insbesondere sollten die Versuche Auskunft darüber geben, wie eng die Kopplung zwischen den Parametern Hypoxie und Aktivität und der Bildung des jeweiligen glykolytischen Endprodukts ist, und welche Bedeutung der anaeroben Glykolyse gegenüber den anderen energieliefernden Mechanismen in den beiden Situationen zukommt.

3.1.1 Isometrische Kontraktion unter Normoxie und Hypoxie

Die eingangs erwähnten Untersuchungen von Pörtner et al. (1984) hatten gezeigt, daß Sipunculus nudus bei wiederholtem Eingraben vorwiegend Octopin, unter hypoxen Bedingungen in Ruhe jedoch vorwiegend Strombin, als Endprodukt der anaeroben Glykolyse bildet. Das Präparat des isoliert kontrahierenden Introvertretraktors bot sich an, eine funktionsbedingte und eine biotopbedingte Hypoxie gleichzeitig zu simulieren, d.h. den Muskel unter hypoxen Bedingungen zur Kontraktion zu bringen. Dieser Versuch sollte zunächst klären, ob Sauerstoffmangel in der Umgebung des Muskels auch bei Aktivität zu einer Akkumulation von Strombin anstelle von Octopin führt. Ferner hatten vorhergehende Untersuchungen (Kreutzer, 1982) ergeben, daß isometrisch kontrahierende

[1]Der Ausdruck "biotopbedingte" Anaerobiose erscheint im Zusammenhang mit Muskelpräparaten wenig treffend. Allgemein bezeichnet man jedoch mit diesem Begriff den anaeroben Energiestoffwechsel unter langfristigem, d.h. über Stunden oder Tage andauerndem, Sauerstoffmangel. Dabei wird generell nicht unterschieden, ob es sich um Sauerstoffmangel im natürlichen Lebensraum des Tieres oder um simulierte hypoxe Bedingungen, z.B. durch eine Inkubation in stickstoffbegastem Wasser, handelt. In diesem Sinne wurde der Begriff, als "terminus technicus", in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Retraktoren bei Reizfrequenzen von 0.1 Hz (6 min^{-1}) unter Normoxie bis zu 3.9 umol ATP/g·min aus dem anaeroben Stoffwechsel gewinnen; die Frage nach der aeroben Energiebereitstellung unter diesen Bedingungen blieb jedoch offen. Zur Abschätzung dieses aeroben Anteils bot sich ein Vergleich der Energieproduktion sowie der Kraftentwicklung unter aeroben und anaeroben Bedingungen an.

Die Daten früherer Versuchsreihen unter normoxen Bedingungen schienen für einen direkten Vergleich nicht geeignet, da der Energiestoffwechsel der Tiere starken jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt. Daher wurden die Introvertretraktoren sowohl unter hypoxen als auch unter normoxen Bedingungen für Zeiträume bis zu 1 h zu Serien von isometrischen Einzelkontraktionen stimuliert oder ruhend im Versuchsgefäß inkubiert.

Tabelle 1: Maximale Kraftentwicklung (K_{max}) und relative Kraftentwicklung (K_t/K_{max}) aller Versuchsmuskeln sowie der für die Metabolitbestimmung verwendeten Muskeln (*) zu verschiedenen Zeitpunkten isometrischer Kontraktion mit einer Frequenz von 6/min unter Normoxie und Hypoxie.

NORMOXIE

min	n	K_t/K_{max}	n	K_t/K_{max}*	K_{max}* (mN)
5	16	0.73 ±0.15	/	/	/
10	16	0.48 ±0.15	4	0.41 ±0.10	119 ±31
20	12	0.23 ±0.11	4	0.26 ±0.13	97 ±19
30	8	0.10 ±0.07	/	/	/
40	8	0.06 ±0.04	4	0.07 ±0.05	110 ±37
50	4	0.02 ±0.03	/	/	/
60	4	0.02 ±0.02	4	0.02 ±0.02	108 ±24

K_{max}: 108 ± 26 mN (n = 16)

HYPOXIE

min	n	K_t/K_{max}	n	K_t/K_{max}*	K_{max}* (mN)
5	17	0.65 ±0.18	/	/	/
10	17	0.41 ±0.14	4	0.40 ±0.18	111 ±31
20	13	0.18 ±0.08	4	0.19 ±0.05	119 ±40
30	9	0.08 ±0.07	/	/	/
40	9	0.04 ±0.04	4	0.04 ±0.05	144 ±24
50	5	0.03 ±0.03	/	/	/
60	5	0.02 ±0.02	5	0.02 ±0.02	101 ±29

K_{max}: 118 ± 33 mN (n = 17)

Tabelle 1 und Abbildung 10 zeigen die Veränderungen der Kraftentwicklung der Muskeln im Verlauf der einstündigen Kontraktionsperiode bei einer Frequenz von 0.1 Hz. Die maximale Kraftentwicklung, die nach 8 ± 3 (hypox) bzw. 9 ± 4 (normox) Kontraktionen erreicht wird, variiert sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie um einen Wert von 110 mM (ca. 11 g). Innerhalb von 10 min sinkt die Kraftentwicklung auf einen Wert unter 50 % der Maximalkraft, nach 30 min werden noch weniger als 10 %, nach 60 min nur noch 2 % der Maximalkraft entwickelt. Die relative Kraftentwicklung der hypoxen Muskeln ist tendenziell niedriger als die der normoxen, der Unterschied zwischen normoxen und hypoxen Muskeln beträgt jedoch weniger als 10 %. Mit dem exponentiellen Abfall der Kraftentwicklung geht eine exponentielle Abnahme des Phospho-L-Argininggehaltes von 23.2 bzw. 23.9 bis auf 6.6 (normox) bzw. 6.5 umol/g FG (hypox) einher; der ATP-Gehalt des Muskels sinkt dagegen innerhalb einer Stunde nur um etwa 30 % des Ausgangswertes.

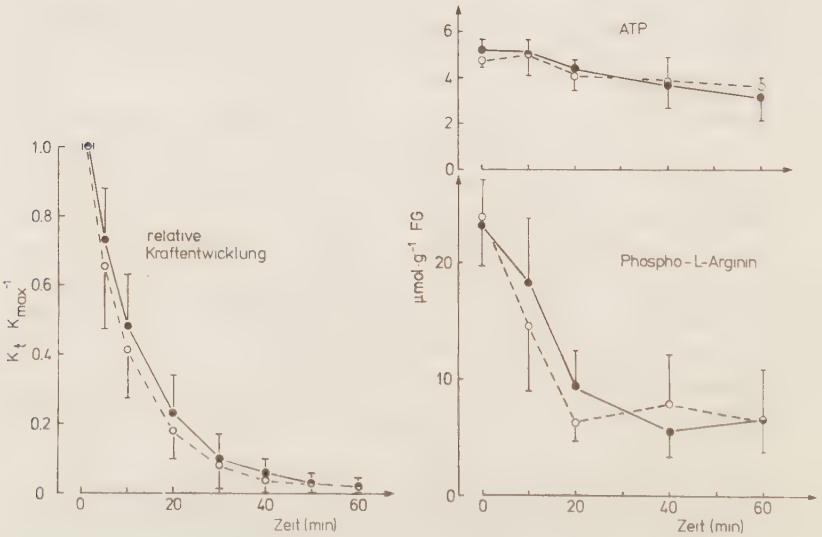


Abbildung 10: Isometrische Kontraktion unter Normoxie und Hypoxie. Relative Kraftentwicklung sowie ATP und Phospho-L-Argininggehalt (umol/g FG) des Retraktors im Verlauf einer 1 h Kontraktionsperiode bei einer Kontraktionsfrequenz von 0.1 Hz. ●——● Normoxie; o---o Hypoxie.

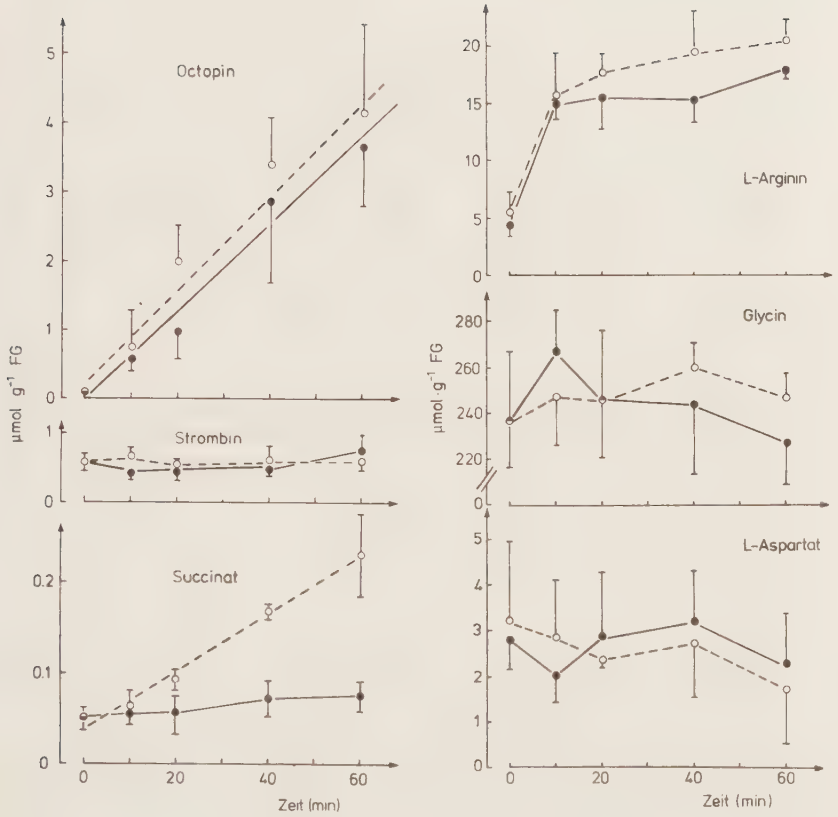


Abbildung 11: Isometrische Kontraktion unter Normoxie und Hypoxie. Octopin-, Strombin- und Succinatgehalt des Retraktors sowie Gehalte der korrespondierenden Aminosäuren (umol/g FG) im Verlauf einer 1 h Kontraktionsperiode bei einer Kontraktionsfrequenz von 0.1 Hz. ●——● Normoxie; o---o Hypoxie.

Dem exponentiellen Phosphagenabbau steht ein linearer Anstieg des Octopingehaltes von 0.05 auf 3.7 (normox) bzw. 4.1 umol/g FG (hypox) gegenüber (s. Tabelle 2 und Abbildung 11). In beiden Metaboliten zeigt sich ein tendenzieller Unterschied zwischen normoxen und hypoxen Muskeln; der Phosphagenabbau und die Octopinakkumulation scheinen unter Hypoxie geringfügig schneller zu erfolgen. Eine Kovarianzanalyse der Octopinwerte wies jedoch keine signifikanten Unterschiede aus. Die berechneten Octopinbildungsraten betrugen 3.84 umol/g FG·min unter Normoxie ($r = 0.91$) und 4.08 umol/g FG·min unter Hypoxie ($r = 0.89$). Eine Ausscheidung in das Inkubationsmedium konnte nicht nachgewiesen werden. In ruhenden Muskeln veränderten sich die Gehalte der genannten Metabolite im betrachteten Zeitraum nicht nennenswert.

Unter keiner der gewählten Bedingungen ließ sich eine Akkumulation von Strombin nachweisen, dessen Gewebegehalt zwischen 0.4 und 0.7 umol/g FG beträgt. Die Konzentrationen von Alanopin und Laktat liegen im Introvertretraktor unter der Nachweisgrenze. Damit bleibt Octopin auch bei Aktivität, sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie, das einzige glykolytische Endprodukt.

In der Konzentration der "opinbildenden" Aminosäuren lassen sich ebenfalls nur geringe Unterschiede zwischen normox und hypox kontrahierenden Muskeln nachweisen (s. Abbildung 11). Der Argininggehalt steigt mit dem Abfall des Phospho-L-Argininggehaltes um etwa 15 umol/g FG an, wobei die Werte der normoxen Muskeln geringfügig über denen der hypoxen liegen. Der Glycingehalt bleibt in beiden Fällen bei etwa 240 umol/g FG konstant; der Alaningehalt (D- + L-Alanin) schwankt zwischen 5 und 9 umol/g FG. Aus der Gruppe der übrigen Aminosäuren ist noch das L-Aspartat, ein potentielles Substrat der Succinatsynthese, erwähnenswert, das in normoxen Muskeln Werte um 2.5 umol/g FG aufweist, während in hypoxen eine abnehmende Tendenz besteht, die sich allerdings aufgrund der hohen Individualschwankungen nicht eindeutig belegen läßt.

Tabelle 2: Funktionsbedingte Anaerobiose unter Normoxie und Hypoxie. Metabolitgehalt des isolierten Introvertretraktors von S. nudus in Ruhe und nach verschiedenen Zeiten isometrischer Kontraktion (6/min) unter Normoxie (n = 4; Normoxie, Ruhe, 20 min: n = 3; Hypoxie, Kontraktion, 60 min: n = 5).

	NORMOXIE		HYPOXIE	
	ATP			
min	Ruhe	Kontraktion	Ruhe	Kontraktion
0	5.2 ±0.5	/	4.7 ±0.3	/
10	/	5.1 ±0.6	/	5.0 ±0.9
20	4.8 ±0.4	4.4 ±0.4	4.8 ±0.4	4.1 ±0.6
40	4.7 ±0.1	3.6 ±1.0	5.2 ±0.3	3.9 ±1.0
60	4.7 ±0.7	3.1 ±1.0	5.2 ±0.5	3.6 ±0.4
	Phospho-L-Arginin			
min	Ruhe	Kontraktion	Ruhe	Kontraktion
0	23.2 ±3.5	/	23.9 ±3.3	/
10	/	18.3 ±5.6	/	14.5 ±5.6
20	23.8 ±2.8	9.3 ±3.1	21.8 ±3.8	6.9 ±1.6
40	24.6 ±2.7	5.6 ±2.3	22.9 ±3.0	7.9 ±4.3
60	21.7 ±3.2	6.6 ±4.3	23.7 ±2.5	6.5 ±2.7
	L-Arginin			
min	Ruhe	Kontraktion	Ruhe	Kontraktion
0	4.4 ±0.9	/	5.6 ±1.7	/
10	/	14.9 ±1.3	/	15.7 ±3.7
20	4.3 ±0.3	15.5 ±2.8	5.6 ±1.7	17.6 ±1.6
40	4.3 ±1.4	15.3 ±2.0	5.5 ±1.4	19.2 ±3.8
60	4.2 ±1.5	18.0 ±0.9	5.7 ±1.4	20.4 ±1.8
	Octopin			
min	Ruhe	Kontraktion	Ruhe	Kontraktion
0	0.05 ±0.01	/	0.06 ±0.03	/
10	/	0.63 ±0.23	/	0.69 ±0.58
20	0.07 ±0.05	1.02 ±0.45	0.09 ±0.02	1.95 ±0.56
40	0.06 ±0.03	2.89 ±1.21	0.14 ±0.14	3.37 ±0.72
60	0.07 ±0.03	3.70 ±0.89	0.10 ±0.06	4.09 ±1.37
	Strombin			
min	Ruhe	Kontraktion	Ruhe	Kontraktion
0	0.56 ±0.12	/	0.56 ±0.12	/
10	/	0.45 ±0.12	/	0.64 ±0.15
20	0.38 ±0.08	0.49 ±0.16	0.61 ±0.06	0.55 ±0.07
40	0.51 ±0.17	0.51 ±0.13	0.62 ±0.10	0.56 ±0.23
60	0.57 ±0.14	0.72 ±0.19	0.48 ±0.19	0.65 ±0.18

Tabelle 3: Funktionsbedingte Anaerobiose unter Normoxie und Hypoxie (Legende s. Tabelle 2).

	NORMOXIE		HYPOXIE	
	Succinat			
min	Ruhe	Kontraktion	Ruhe	Kontraktion
0	0.052 ±0.015	/	0.050 ±0.013	/
10	/	0.057 ±0.014	/	0.062 ±0.016
20	0.062 ±0.040	0.055 ±0.015	0.070 ±0.005	0.093 ±0.011
40	0.061 ±0.022	0.072 ±0.020	0.088 ±0.036	0.167 ±0.007
60	0.033 ±0.012	0.075 ±0.016	0.084 ±0.022	0.229 ±0.045
	L-Malat			
min	Ruhe	Kontraktion	Ruhe	Kontraktion
0	0.088 ±0.031	/	0.063 ±0.006	/
10	/	0.094 ±0.030	/	0.084 ±0.045
20	0.037 ±0.015	0.196 ±0.065	0.116 ±0.088	0.211 ±0.023
40	0.051 ±0.020	0.369 ±0.096	0.059 ±0.014	0.247 ±0.151
60	0.050 ±0.021	0.356 ±0.131	0.066 ±0.014	0.348 ±0.213

	Glycin	L-Aspartat	Glycin	L-Aspartat
min	Kontraktion	Kontraktion	Kontraktion	Kontraktion
0	236.5 ±30.4	2.81 ±0.64	236.6 ±19.6	3.18 ±1.82
10	266.5 ±18.5	2.02 ±0.62	247.0 ±21.1	2.82 ±1.29
20	246.3 ±29.7	2.84 ±1.55	245.3 ±24.5	2.34 ±0.15
40	243.3 ±30.2	3.19 ±1.12	259.4 ±11.0	2.68 ±1.50
60	227.5 ±18.4	2.23 ±1.14	246.1 ±11.6	1.71 ±1.18

	D,L-Alanin	L-Glutamat	D,L-Alanin	L-Glutamat
min	Kontraktion	Kontraktion	Kontraktion	Kontraktion
0	5.99 ±1.02	2.59 ±0.71	6.57 ±3.54	3.17 ±1.75
10	5.39 ±2.18	2.43 ±1.05	6.82 ±1.43	2.95 ±1.21
20	8.39 ±3.23	3.34 ±1.06	8.36 ±1.72	3.58 ±0.59
40	9.35 ±3.42	3.23 ±0.59	7.95 ±4.12	3.10 ±0.13
60	7.35 ±1.74	2.65 ±1.15	6.96 ±2.32	2.51 ±1.18

Neben den in der Tabelle 3 aufgeführten Aminosäuren enthält der Retraktor 50 - 80 umol/g FG Taurin sowie Threonin, Serin Glutamin, Lysin und Histidin in Konzentrationen unter 0.5 umol/g FG. Eine "unbekannte" Aminosäure, deren Konzentration bei der Kontraktion stark abnahm, konnte mittels internen Standards als Phospho-L-Arginin identifiziert werden. Es wurde bei der säulenchromatographischen Bestimmung nicht, wie zunächst angenommen, hydrolysiert.

Der einzige, deutlich signifikante Unterschied zwischen der Versuchsreihe unter Normoxie und Hypoxie bestand in der Konzentrationsänderung des Succinats, das unter Hypoxie linear von 0.05 auf 0.23 umol/g FG ansteigt, während unter Normoxie nur ein leicht erhöhter Gehalt von 0.075 umol/g FG bestimmt wurde. In ruhenden, hypoxen Muskeln steigt der Succinatgehalt ebenfalls geringfügig bis auf 0.09 umol/g FG. In den übrigen Metaboliten lassen sich in ruhenden Muskeln, während des Versuchszeitraumes von 1 h, weder unter Normoxie noch unter Hypoxie signifikante Veränderungen nachweisen.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe lassen sich wie folgt zusammenfassen: Unter Normoxie kontrahierende Introvertretraktoren unterscheiden sich sowohl in ihrer Kraftentwicklung als auch in fast allen Metaboliten des aneroben Energiestoffwechsels nur geringfügig von solchen, die unter Hypoxie kontrahieren. Der einzige deutliche Unterschied besteht in der Succinatakkumulation, die in hypox kontrahierenden Muskeln zu einem linearen Anstieg des Succinatgehaltes führt, sich in normoxen Muskeln jedoch nur in geringem Umfang nachweisen läßt. Auf die Art des bei Aktivität gebildeten Endprodukts hat Sauerstoffmangel in der Umgebung des Retraktors offensichtlich keinen Einfluß. Sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie wird ausschließlich Octopin gebildet.

3.1.2 Sauerstoffverbrauch

Auskunft über die Kapazität der aeroben Energiegewinnung

eines Muskels geben Sauerstoffverbrauchsmessungen, die jedoch aus methodischen Gründen (s. 2.3) nur an ruhenden Introvertretraktoren durchgeführt werden konnten. Im gleichen Experiment wurde auch der Sauerstoffverbrauch von Präparaten des Hautmuskelschlauchs sowie der Coelomflüssigkeit bestimmt.

Der Hautmuskelschlauch (s. Tabelle 4) zeigt mit 0.74 umol/g·h den höchsten Sauerstoffverbrauch, der Verbrauch des Retraktors liegt mit 0.56 umol/g·h etwas niedriger, während die Coelomflüssigkeit bzw. die darin enthaltenen Zellen nur 0.12 umol/ml·h verbraucht. Aus diesen Werten läßt sich ausgehend von einem ATP/O_2-Verhältnis der Atmungskette von 6, und unter der Voraussetzung, daß Glykogen das Substrat des aeroben Energiestoffwechsels ist (6 O_2/Glykosyleinheit), auch die aerobe ATP-Produktion und die aerobe Glykolyserate berechnen. Diese Werte sind ebenfalls in Tabelle 4 aufgeführt. Für den Retraktor ergibt sich eine aerobe ATP-Produktion von 3.36 umol ATP/g·h und eine aerobe Glykolyserate von 0.09 umol Glykosyleinheiten/g·h.

Einigen Ansätzen wurde nach einer Meßperiode von 2 h der Entkoppler 2,4-Dinitrophenol (Endkonzentration 1 mM) zugesetzt, um einen Anhaltspunkt zu erhalten, in welchem Ausmaß sich der Sauerstoffverbrauch der Muskeln steigern läßt. Der Verbrauch des Hautmuskelschlauchs stieg danach auf 174 %, der des Retraktors auf 164 %, des vorher gemessenen Wertes.

Tabelle 4: Sauerstoffverbrauch (umol/g·h) isolierter Retraktoren, Hautmuskelschlauchgewebe (HMS) und der Coelomfüssigkeit von S. nudus sowie daraus berechnete aerobe ATP Produktion (umol ATP/g·h) und aerober Glykolysefluß (umol Glykosyleinheiten/g·h). n = 5. *umol/ml·h.

	O_2-Verbrauch	aerobe ATP-Produktion	aerober Glykolysefluß
Retraktor	0.56 ±0.10	3.36 ±0.62	0.09 ±0.02
HMS	0.74 ±0.13	4.43 ±0.77	0.12 ±0.02
Coelomfl.*	0.12 ±0.03	0.72 ±0.15	0.02 ±0.004

3.1.3 Aktivität unter hypoxen Bedingungen in vivo

Die Versuche von Körner (1985), der S. nudus unter hypoxen Bedingungen zu mehrmaligem Eingraben veranlaßte, und dabei unter anderem auch die gesamte Grabzeit der Tiere protokollierte, boten sich an, den Energiestoffwechsel des Retraktors unter in vivo und in vitro Bedingungen zu vergleichen, um abschätzen zu können, in welchem Ausmaß die vorhandene Kapazität der anaeroben Energieproduktion unter extremen in vivo-Bedingungen (Aktivität + Hypoxie) genutzt wird. Die betrachteten Zeiträume der Aktivität sind in beiden Versuchsreihen ähnlich: Die isolierten Muskeln kontrahierten bis zu 60 min lang, für 8maliges Eingraben benötigten die Tiere maximal 68 min. Besonderes Augenmerk galt dem Energiestatus und der Opinproduktion des Retraktors in vivo (s. Tabelle 5).

Der ATP-Gehalt der Muskeln änderte sich im Versuchszeitraum nicht signifikant. Ein leichter Anstieg des ADP-Gehaltes von 0.49 auf 0.74 umol/g FG und ein leichter Anstieg des AMP-Gehaltes von 0.054 auf 0.110 umol/g FG weist jedoch auf einen geringfügigen ATP-Abbau hin. Eine abnehmende Tendenz zeigt sich auch im Phospho-L-Arginin-Gehalt, der ausgehend von einem Kontrollwert von 20.9 umol/g FG jedoch nicht unter 17 umol/g FG sinkt. In Abbildung 10 ist der Octopin- und der Strombingehalt der Muskeln gegen die mittlere Versuchsdauer aufgetragen. Der Octopingehalt steigt linear auf 1.1 umol/g FG, das entspricht einer mittleren Bildungsrate von 1.1 umol/g·h ($r = 0.85$). Der Strombingehalt der Retraktoren variiert sehr stark und zeigt in der ersten Versuchshälfte eher eine abnehmende Tendenz. Erst gegen Ende der Versuchsperiode, in Retraktoren von Tieren die sich 8 mal eingegraben hatten, ließ sich ein erhöhter Strombingehalt von 1.86 umol/g FG gegenüber 1.17 umol/g FG in Kontrolltieren, nachweisen. Die aus der Summe der Opingehalte berechnete Glykolyserate betrug 1.07 umol Glykosyleinheiten/g FG·h ($r = 0.75$).

Tabelle 5: Funktionsbedingte Anaerobiose des Introvertretraktors *in vivo*. Metabolitgehalt (umol/g FG) nach verschiedenen Anzahlen von Grabzyklen unter hypoxen Bedingungen, sowie für das mehrmalige Eingraben benötigte Zeit (min; Daten aus Körner, 1985). n = 4 - 5;

Grabzyklen	ATP	ADP	AMP
Kontrolle	4.6 ±0.5	0.49 ±0.08	0.054 ±0.010
1	4.8 ±0.9	0.53 ±0.08	0.073 ±0.012
2	4.3 ±1.7	0.46 ±0.06	0.078 ±0.024
4	4.7 ±0.4	0.55 ±0.05	0.076 ±0.055
6	5.0 ±0.5	0.74 ±0.18	0.110 ±0.030
8	4.9 ±0.5	0.56 ±0.08	0.090 ±0.021

Grabzyklen	Phospho-L-Arginin	L-Arginin	Octopin
Kontrolle	20.9 ±2.6	5.2 ±1.5	0.04 ±0.01
1	22.9 ±5.1	5.6 ±1.5	0.14 ±0.07
2	20.9 ±3.8	7.0 ±2.1	0.31 ±0.19
4	18.0 ±3.2	10.4 ±2.0	0.81 ±0.24
6	17.2 ±3.2	10.3 ±1.8	0.92 ±0.28
8	18.0 ±3.9	11.7 ±0.8	1.09 ±0.12

Grabzyklen	Strombin	Succinat	Grabzeit (min)
Kontrolle	1.17 ±0.26	0.048 ±0.003	0
1	1.00 ±0.56	0.046 ±0.024	9.6 ± 2.4
2	0.72 ±0.22	0.041 ±0.021	20.4 ± 7.8
4	1.33 ±0.43	0.067 ±0.021	37.8 ±10.2
6	1.42 ±0.34	0.078 ±0.099	49.2 ±13.2
8	1.86 ±0.55	0.064 ±0.059	52.8 ±13.8

3.1.4 Inkubation ruhender Muskeln unter hypoxen Bedingungen

Zur Simulation einer langfristigen, biotopbedingten Hypoxie wurden isolierte Muskeln für bis zu 7.5 h in stickstoffbegastem Seewasser inkubiert. Dieser für eine experimentelle biotopbedingte Hypoxie relativ kurze Zeitraum wurde gewählt, da andere Untersuchungen (z.B. Pörtner et al., 1984a; Siegmund et al., 1985) ergeben hatten, daß die Akkumulation glykolytischer Endprodukte vorwiegend in den ersten 12 h der Hypoxie erfolgt. Unter Berücksichtigung der unter 3.1.1 beschriebenen Ergebnisse rückte in diesem Versuch vor allem die Frage in den Vordergrund, ob isolierte Muskeln überhaupt zu einer Strombinakkumulation fähig sind, da in vivo auch eine hormonelles oder nervöses Signal als Umschaltmechanismus der Pyruvatreduktasen denkbar wäre.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Der ATP-Gehalt der Muskeln veränderte sich während der 7.5stündigen Inkubation nicht signifikant, es werden jedoch etwa 8 umol Phospho-L-Arginin abgebaut. Diesem Wert korrespondiert der Anstieg des L-Argininggehaltes von 5.2 auf 12.4 umolg FG (s. Abbildung 12). Der Glycingehalt liegt etwa um das 50fache über dem Kontrollwert des L-Arginins und ändert sich bei hypoxer Inkubation nicht.

Die qualitativen Veränderungen in den Metbolitgehalten des Succinatweges entsprechen dem typischen Bild dieses Stoffwechsels: Der Succinatgehalt steigt von 0.05 auf 0.53 umol/g FG; Succinat war in geringem Umfang (unter 10 % der Gesamtproduktion) auch im Inkubationsmedium nachweisbar. Der Aspartatgehalt nimmt um 0.5 umol/g FG von 2.3 auf 1.8 umol/g FG ab. Läßt man die hohe Streuung der Werte unberücksichtigt, so wird dieser Aspartatabbau quantitativ von der Akkumulation des Transaminierungsproduktes L-Alanin übertroffen. Der L-Alaningehalt steigt um 1.5 umol/g FG von 4.4 auf 5.9 umol/g FG. Dieses Phänomen wurde von vielen Autoren beobachtet und stellt einen Problempunkt des Stoffwechselschemas der Succinatgärung dar. Die Reaktionssequenz beinhaltet eine Übertragung der Aminogruppe von Aspartat auf Pyruvat, so daß

ein Aspartatabbau nur zu einer äquimolaren Akkumulation von Alanin führen dürfte (vgl. Siegmund, 1986).

Tabelle 6: Inkubation isolierter Introvertretraktoren von S. nudus unter hypoxen Bedingungen. Metabolitgehalt (umol/g FG) in Kontrollmuskeln (0 h) und nach verschiedenen Zeiten der Inkubation in stickstoffbegastem Seewasser.

h	n	L-Arginin	Octopin	Glycin	Strombin
0	6	5.2 ±1.5	0.082 ±0.040	226.3 ±17.2	0.74 ±0.27
2.5	4	10.0 ±1.7	0.234 ±0.071	/	0.83 ±0.19
5	5	12.6 ±2.0	0.334 ±0.096	/	1.06 ±0.16
7.5	6	12.4 ±2.3	0.312 ±0.080	226.6 ±17.8	1.76 ±0.17

h	n	L-Aspartat	L-Alanin	Succinat	L-Malat
0	6	2.33 ±0.38	4.4 ±1.9	0.051 ±0.018	0.070 ±0.036
2.5	4	1.97 ±0.48	/	0.280 ±0.081	/
5	5	1.66 ±0.44	/	0.463 ±0.076	/
7.5	6	1.76 ±0.31	5.9 ±1.7	0.526 ±0.106	0.172 ±0.038

h	n	ATP	Phospho-L-Arginin
0	6	4.8 ± 0.4	24.9 ±6.2
2.5	4	/	20.6 ±1.7
5	5	/	17.2 ±2.1
7.5	6	5.2 ± 0.7	17.1 ±3.4

Im Verlauf der Hypoxie zeigen sich in den glykolytischen Endprodukten deutliche Veränderungen. Nach 7.5 h weisen die Muskeln sowohl erhöhte Strombin- als auch erhöhte Octopingehalte auf. Der Strombingehalt steigt etwa um den Faktor 2.5 von 0.74 umol/g FG auf 1.76 umol/g FG, der Octopingehalt steigt von 0.08 auf 0.31 umol/g FG. Letzteres entspricht einer Verdreifachung des Kontrollwertes, macht jedoch nur 1/6 der gesamten Opinproduktion aus. Alanopin ist nur in Spuren vorhanden. Eine Ausscheidung der glykolytischen Endprodukte in das Inkubationsmedium ließ sich nicht nachweisen.

Der Retraktor bildet also auch als isoliertes Organ bei langfristiger Hypoxie Strombin als Endprodukt der anaeroben

Glykolyse. Eine Octopinakkumulation läßt sich zwar ebenfalls nachweisen, tritt jedoch in ruhenden Muskeln quantitativ in den Hintergrund.

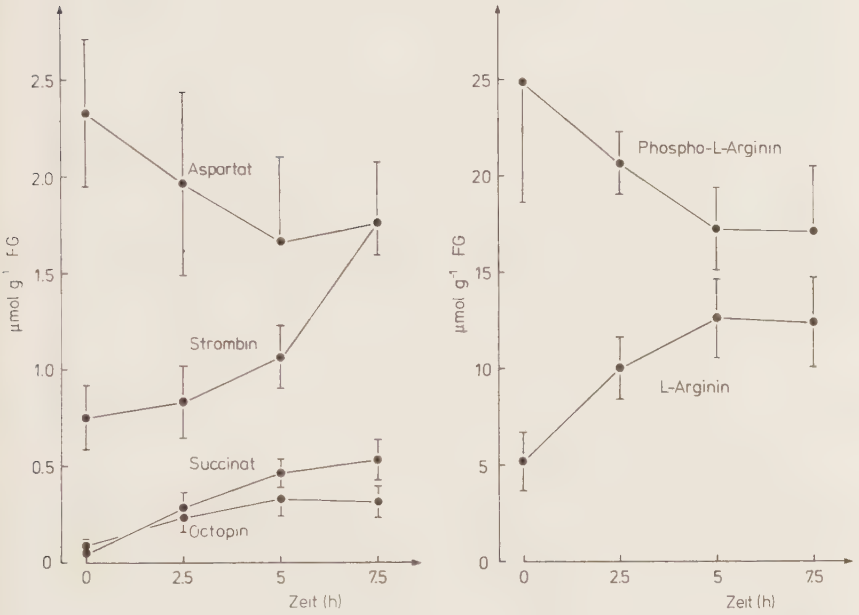


Abbildung 12: Langfristige Hypoxie isolierter, ruhender Retraktoren. Gehalt der Metabolite des anaeroben Energiestoffwechsels (umol/g FG) im Verlauf einer bis zu 7.5 h Inkubation in stickstoffbegastem Seewasser.

Um die Auswirkung der Aminosäurekonzentration auf die Opinbildung zu prüfen, wurden Muskeln unter hypoxen Bedingungen in synthetischem Seewasser inkubiert, das 20 mM L-Arginin enthielt. Durch eine hohe Argininkonzentration im Medium sollte der intrazelluläre Argiringehalt erhöht werden. Der Argiringehalt von hypox inkubierten Muskeln, die in Medium ohne Arginin inkubiert waren betrug 7.5 $\pm$ 1.2 umol/g FG, in Medium mit 20 mM Arginin enthielten die Muskeln 12.1 $\pm$ 1.0 umol/g FG. Subtrahiert man den extrazellulären Anteil des Argiringehaltes der mit Arginin inkubierten Muskeln, der 3.9

umol/g FG beträgt, so ergibt sich ein mittlerer intrazellulärer Gehalt von 8.2 umol/g FG (Fraktion des Zellwassers = 0.575, Extrazellulärfraktion Q = 0.240; s. 3.3.2). Dieser Wert liegt im Bereich der Schwankungen des Kontrollwertes (7.5 ± 1.2 umol/g FG). Eine Auswirkung auf die Octopinsynthese konnte nicht nachgewiesen werden. Der Octopingehalt der Kontrollmuskeln (hypox, ohne Arginin) betrug 0.19 ± 0.06 umol/g FG, mit Arginin inkubierte Muskeln enthielten 0.17 ± 0.09 umol/g FG. Eine Inkubation unter normoxen Bedingungen führte zu einem ähnlichen Ergebnis. Kontrollen enthielten 3.4 ± 0.6, argininkubierte Muskeln 8.0 ± 0.9 umol/g FG. Abzüglich des extrazellulären Gehaltes entspricht dies einer Erhöhung des intrazellulären Argingehaltes um nur 0.7 umol/g FG. Der Octopingehalt der Kontrollen betrug 47 ± 20 nmol/g FG, der der argininkubierten Muskeln 58 ± 25 nmol/g FG.

3.2 Die Pyruvatreduktasen
- Aktivität und Eigenschaften -

Im ersten Versuchsabschnitt wurden die physiologischen Gegebenheiten charakterisiert, die mit einer bevorzugten Bildung von Octopin bei starker Muskelaktivität und Strombin bei langfristiger Hypoxie verbunden sind. Da die Reduktion des Pyruvats den Verzweigungspunkt für die Bildung unterschiedlicher glykolytischer Endprodukte darstellt, wurden in diesem zweiten Versuchskomplex die diese Reaktion katalysierenden Enzyme untersucht. Dabei standen die Fragen im Vordergrund, 1. warum von *S. nudus* , aus dem Spektrum der möglichen glykolytischen Endprodukte, gerade Octopin und Strombin gebildet werden und, 2. ob Unterschiede in den Eigenschaften der Pyruvatreduktasen bestehen, die Hinweise auf einen möglichen "Umschaltmechanismus" der anaeroben Endproduktbildung geben.

3.2.1 Aktivitäten und Enzymmuster in verschiedenen Muskelgeweben

a) Aktivitäten

Das Spektrum der potentiellen glykolytischen Endprodukte wird zum einen durch das Vorkommen der korrespondierenden Aminosäuren, zum anderen durch das Vorkommen der entsprechenden Enzymaktivitäten bestimmt. Entsalzte Rohextrakte aus verschiedenen Muskelgeweben wurden daher auf ihre Laktat- und Opindehydrogenaseaktivität hin untersucht.

Weder in Extrakten der Ring- und Längsmuskulatur noch in Extrakten des Introvertretaktormuskels ließ sich Laktat- oder Tauropindehydrogenaseaktivität nachweisen. Die Aktivitäten für die reduktive Kondensation von Pyruvat mit den Aminosäuren L-Arginin (Octopindehydrogenase), Alanin (Alanopindehydrogenase) und Glycin (Strombindehydrogenase) sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Strombin- (StrDH), Alanopin- (AloDH) und Octopindehydrogenaseaktivität (ODH) in entsalzten Rohextrakten verschiedener Muskelgewebe von *S. nudus*. A. U/g FG; B. U/mg Protein. n = 5.

A. Gewebe	StrDH	AloDH	ODH
Retraktor	12.9 ±1.5	29.9 ± 4.1	228.8 ± 15.8
Längsmuskulatur	8.8 ±2.1	42.9 ±14.7	404.0 ± 68.0
Ringmuskulatur	9.6 ±2.5	55.8 ±21.6	630.2 ±127.6

B. Gewebe	StrDH	AloDH	ODH
Retraktor	0.47 ±0.04	1.08 ±0.10	8.56 ±0.82
Längsmuskulatur	0.27 ±0.08	1.20 ±0.41	12.62 ±0.82
Ringmuskulatur	0.31 ±0.09	1.88 ±0.66	21.91 ±6.40

In allen drei Geweben, Retraktor, Ring- und Längsmuskulatur, liegt die Octopindehydrogenaseaktivität über der Strombin- und Alanopindehydrogenaseaktivität. Die Ringmuskulatur weist mit 630 U/g FG die höchste, der Retraktor mit 229 U/g FG die niedrigste Octopindehydrogenaseaktivität auf. Die Aktivität der Alanopindehydrogenase beträgt in allen drei Geweben nur etwa 10 % der entsprechenden ODH-Aktivität, noch unter die-

sen Werten liegt die Strombindehydrogenaseaktivität mit 9.6 bzw. 8.8 U/g FG in der Ring- bzw. Längsmuskulatur und 12.9 U/g FG im Retraktor. Das Verhältnis von StrDH- zu AloDH- und ODH-Aktivität ist im Retraktor mit etwa 1 : 2 : 18 etwas höher als in den anderen Geweben, in der Ringmuskulatur z.B. beträgt dieses Verhältnis 1 : 6 : 66.

Bezieht man die Enzymaktivitäten auf den Proteingehalt der Extrakte, um z.B. einen unterschiedlichen Wassergehalt der Gewebe auszugleichen, so ergeben sich nur geringfügige Verschiebungen, da die Proteingehalte aller drei Gewebe im Bereich von 30 $\pm$ 3 mg/g FG liegen.

Die in diesem Versuch bestimmten Aktivitäten, sollten den maximalen katalytischen Aktivitäten entsprechen. Betrachtet man die Werte, ohne Berücksichtigung der quantitativen Unterschiede zwischen den einzelnen Geweben, so läßt sich zusammenfassend feststellen, daß die Fähigkeit, eine reduktive Kondensation von Pyruvat mit den Aminosäuren Arginin, Alanin und Glycin zu katalysieren, in allen drei Geweben vorhanden ist, wobei die maximale Geschwindigkeit mit der die entsprechenden Endprodukte gebildet werden können, in der Reihenfolge Octopin > Alanopin > Strombin abnimmt. In Abschnitt 3.1 konnte aufgezeigt werden, daß Octopin und Strombin auch unter physiologischen Bedingungen gebildet werden, eine Akkumulation von Alanopin war jedoch nicht nachweisbar.

b) Enzymmuster

Der Befund, daß S. nudus mehrere Enzymaktivitäten besitzt, warf in Verbindung mit dem Befund, daß in marinen Invertebraten Opindehydrogenasen relativ breiter Spezifität vorkommen (Ellington, 1980), die Frage auf, ob die Opindehydrogenaseaktivitäten in S. nudus in verschiedenen Enzymproteinen oder in einer einzigen unspezifischen Opindehydrogenase, lokalisiert sind. Unter diesem Aspekt wurde eine native Gelelektrophorese von Rohextrakten aus verschiedenen Geweben durchgeführt. Eine Hälfte eines Gels wurde jeweils auf Octo-

pindehydrogenase- die andere auf Strombin- oder Alanopindehydrogenaseaktivität angefärbt. Das Phast-Elektrophresesystem zeigte eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit, so daß in Abbildung 13 nur eines der beiden identischen ODH-gefärbten Gele wiedergegeben ist. Die Anfärbung der Opindehydrogenaseaktivität erfolgte nach Latner & Skillen (1968) über die Rückreaktion des Enzyms:

Opin + NAD^+ ==> Aminosäure + Pyruvat + NADH + H^+.

Re Ri L Re Ri L Re Ri L
STROMBIN ALANOPIN OCTOPIN

Abbildung 13: Native Gel-Elektophorese entsalzter Rohextrakte aus verschiedenen Muskelgeweben von S. nudus. Anfärbung der Strombin-, Alanopin- und Octopindehydrogenaseaktivität; Re = Retraktormuskel, Ri = Ringmuskulatur, L = Längsmuskulatur.

Abbildung 13 zeigt, daß in einem Reaktionsansatz mit Strombin oder Alanopin jeweils eine Hauptbande sichtbar wird, die in allen drei Geweben identisch ist (R_f = 0.6). Die Octopindehydrogenaseaktivität erscheint in zwei Haupt- und einer schwächeren Bande mit R_f-Werten von 0.48, 0.51 und 0.54. Die Banden der ODH-Aktivität sind also nicht mit denen der Strombindehydrogenaseaktivität identisch. Dieser Befund weist darauf hin, daß Strombin- und Alanopindehydrogenaseaktivität in ein und demselben, Strombin/Alanopin- und Octopindehydrogenaseaktivität jedoch in unterschiedlichen Proteinen lokalisiert sind.

Tabelle 8: Reinigung der Opindehydrogenasen aus dem Hautmuskelschlauch von Sipunculus nudus. Reinigungsprotokoll einer Präparation aus 90 g Gewebe. % = Prozent der Aktivität im Rohextrakt; F = Reinigungsfaktor = spezifische Aktivität der Präparation : spezifische Aktivität im Rohextrakt.

Reinigungs-schritt	Substrat	Gesamt-aktivität (U)	%	Gesamt-protein (mg)	spez. Aktivität (U/mg)	F
Rohextrakt	Gly	370	100	3922	0.09	/
	Ala	2441	100		0.62	/
	Arg	25670	100		6.55	/
Ammonium-sulfat 45 %	Gly	340	92	2054	0.17	1.9
	Ala	2141	88		1.04	1.7
	Arg	23450	91		11.42	1.7
Ammonium-sulfat 75 %	Gly	284	77	1107	0.26	2.7
	Ala	1796	74		1.62	2.6
	Arg	17332	68		15.64	2.4
Gel-filtration (G-100)	Gly	239	65	197	1.21	13.4
	Ala	1607	66		8.15	13.1
	Arg	16984	67		86.11	13.1

		Fraktion I (ODH)			Fraktion II (StrDH)		
		Akt.	Prot.	U/mg	Akt.	Prot.	U/mg
Ionenaus-tauschchrom. (DEAE)	Gly	22	5.9	3.73	63	15.4	4.10
	Ala	282		47.9	66		4.26
	Arg	3621		614	77		4.97
Ionenaus-tauschchrom. (Mono Q)	Gly	14	3.9	3.66	26	0.19	138
	Ala	214		54.5	24		130
	Arg	2397		610	6		31

3.2.2 Reinigung

Ziel der Reinigung war es, Octopin- und Alanopin/Strombindehydrogenase möglichst weitgehend voneinander zu trennen, um geeignete Präparationen für die vergleichende Untersuchung ihrer Eigenschaften zu erhalten. Da die nativen Elektrophoresen keine Anhaltspunkte für das Vorkommem gewebsspezifischer Isoenzyme der Opindehydrogenasen gegeben hatten, wurde die Reinigung und Charakterisierung auf auf die Enzyme des Hautmuskelschlauchs beschränkt. Zudem hätte die Beschaffung ausreichender Mengen an Retraktorgewebe etwa 6 mal soviel Tiermaterial gefordert.

Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse einer typischen Reinigung. In den beiden ersten Reinigungsschritten, Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltration, ließen sich Octopin und Alanopin/Strombindehydrogenaseaktivität nicht voneinander trennen. Dies gilt sowohl für eine Gelfiltration über Sephadex G-100, als auch für eine Gelfiltration über Superose 6 (s. Abbildung 14). Letztere hat den gleichen Reinigungseffekt, bringt jedoch den Vorteil der schnellen Reinigung (< 5 h) sowie der geringeren Verdünnung des Extrakts (ca. 5fach gegenüber mehr als 10facher Verdünnung mit G-100). Eine in 20 % Schritten fraktionierte Ammoniumsulfatfällung sowie die Wahl eines engeren Trennbereichs der Gelfiltration führten ebenfalls nicht zu einer Auftrennung der beiden Aktivitäten. In jedem Fall wurde jedoch eine etwa 15 fache Vorreinigung des Extrakts erzielt. Diese Vorreinigung erwies sich auch für die anschließenden FPLC-Trennungen als günstig und notwendig, da ungereinigte Extrakte die Säulen "verstopfen" (s. 2.10.10).

Eine anschließende Anionenaustauschchromatographie über die FPLC-Säule Mono Q oder über DEAE-Sephacel führte zu einer Auftrennung der Opindehydrogenasen in verschiedene Isoenzyme (s.Abbildung 15) Die Hauptfraktion der ODH-Aktivität eluierte im ersten Drittel des NaCl-Gradienten (0-200 mM). Strombin und Alanopindehydrogenase fand sich ebenfalls in diesen Fraktionen sowie in einem zweiten Aktivitätsmaximum, das bei höheren Salzkonzentrationen eluierte.

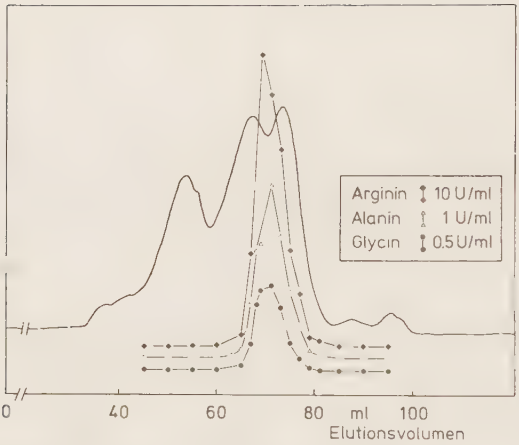


Abbildung 14: Reinigung der Opindehydrogenasen aus S. nudus. Gelfiltration (Superose 6) eines Rohextraktes nach Ammoniumsulfatfällung. Proteingehalt (E_{280nm}) und Opindehydrogenaseaktivitäten des Eluats.

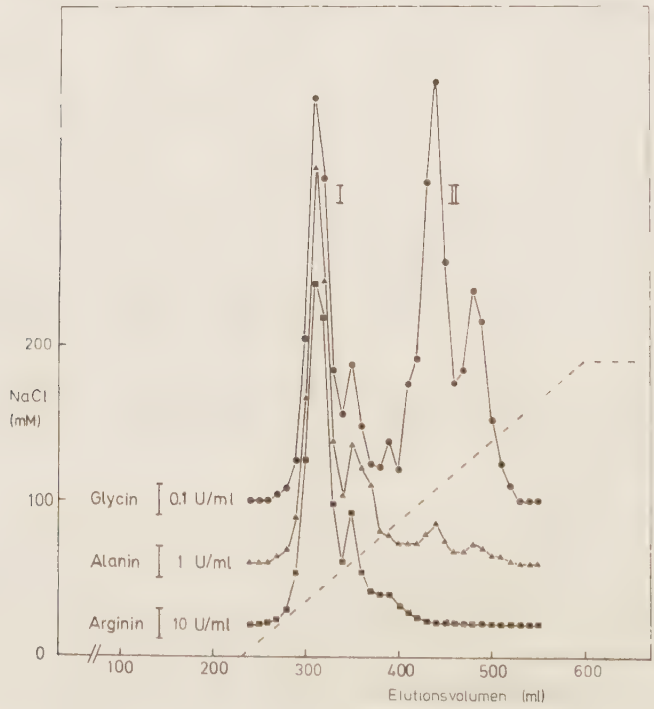


Abbildung 15: Elutionsprofil der DEAE-Anionenaustauschchromatographie nach Superose 6 (s. Abbildung 14).

Die Fraktionen des ersten und zweiten Maximums wurden getrennt vereinigt und nochmals auf dem Anionenaustauscher Mono Q chromatographiert. Abbildung 16 zeigt, daß beide Enzyme Aktivität mit allen drei Aminosäuren zeigen. Das Verhältnis der Aktivitäten mit Arginin, Alanin und Glycin des ersten Proteins, im folgenden als Octopindehydrogenase bezeichnet, beträgt etwa 100 : 10 : 1, das des zweiten, im folgenden als Strombindehydrogenase bezeichneten Proteins, beträgt etwa 1 : 5 : 5. Die Präparation der Octopindehydrogenase zeigt eine spezifische Aktivität von 610 U/mg Protein mit Octopin als Substrat und ließ in der Gelelektrophorese und in der isoelektischen Fokussierung (s. Abbildung 17) keine Verunreinigungen durch andere Proteine erkennen.

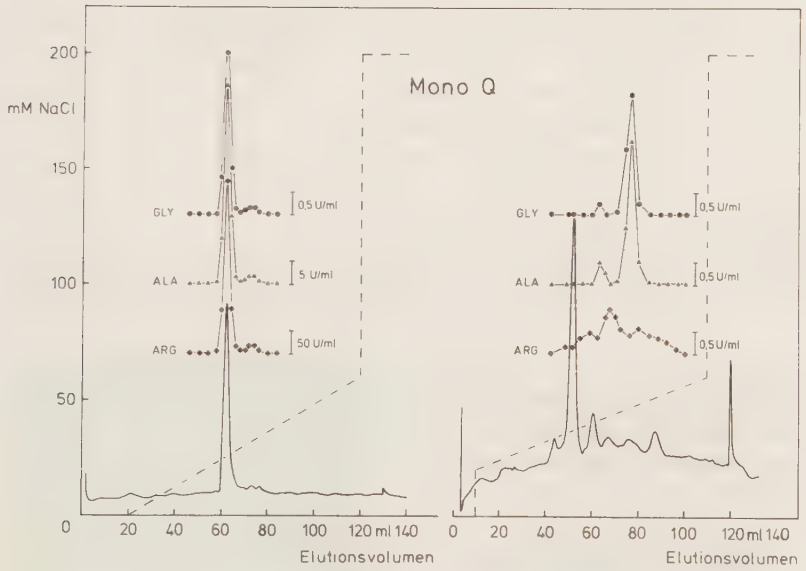


Abbildung 16: Rechromatographie der Octopindehydrogenase (links) und der Strombindehydrogenase (rechts) nach DEAE Anionenaustauschchromatographie mittels der FPLC-Säule Mono Q. Protein- ($E_{280\ nm}$) und Aktivitätsprofil des Eluats.

Die spezifische Aktivität der Strombindehydrogenasepräparation betrug 138 U/mg Protein mit Glycin als Substrat, wies in der Gelelektophorese jedoch noch Verunreinigungen durch andere Proteine auf. Weitere Bemühungen diese zu entfernen (hydrophobe Chromatographie mit Phenyl-Superose, Hydroxylapatit, präparative Elektophorese, Farbligandengele) resultierten stets in einem erheblichen Aktivitätsverlust und verbesserten die Reinheit der Präparation nicht wesentlich. Bemerkenswert ist allerdings, daß die Relation von Strombin- zu Alanopindehydrogenaseaktivität der Präparation in den verschiedenen Reinigungen stets etwa 1 : 1 betrug, während die Octopindehydrogenaseaktivität variierte. In der in Tabelle 8 gezeigten Reinigung beträgt sie 22 %, nach präparativer Elektrophorese betrug sie nur noch 10 % der Strombindehydrogenaseaktivität. Ferner wurden in einigen Chromatographien geringfügige Verschiebungen der Aktivitätsmaxima der Strombin/Alanopin- und der Octopindehydrogenaseaktivität beobachtet. In keinem Fall ließ sich jedoch die Octopindehydrogenaseaktivität vollständig von der Strombin/Alanopindehydrogenaseaktivität abtrennen.

3.2.3 Eigenschaften

a) Molekulargewicht

Mittels Gelfiltration über Sephadex-G-75 wurde für die gereinigten Enzyme sowie für die Octopin und Strombindehydrogenase eines partiell gereinigten Extrakts ein Molekulargewicht im Bereich von 43 000 $\pm$ 2 000 ermittelt.

b) Isoelektrischer Punkt

Der isoelektrische Punkt der Octopindehydrogenase wurde anhand der Chromatofokussierung zu 5.6 und mittels isoelektrischer Fokussierung zu 5.2 bestimmt (s. Abbildung 17). Die Chromatofokussierung wurde mit einem durch Gelfiltration vorgereinigten Extrakt durchgeführt, der sowohl Octopin- als

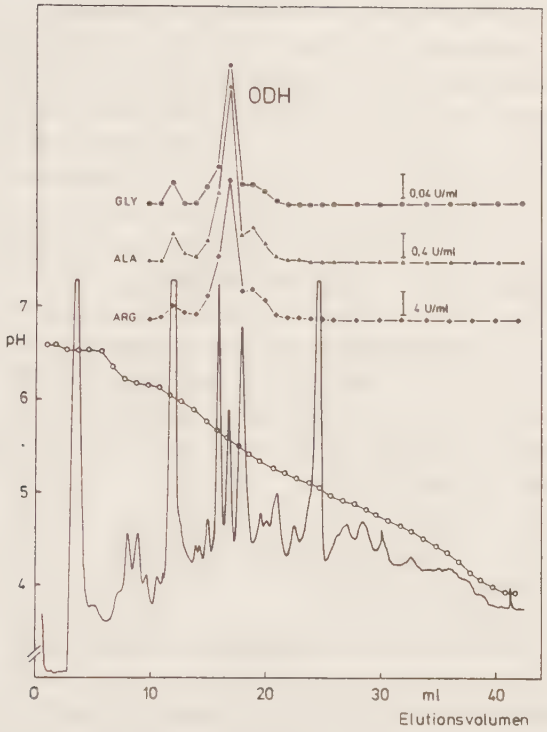


Abbildung 17: Chromatofokussierung eines mittels Gelfiltration vorgereinigten Extrakts der Opindehydrogenasen aus S. nudus. Proteingehalt (E_{280nm}), Opindehydrogenaseaktivität und pH-Wert des Eluats.

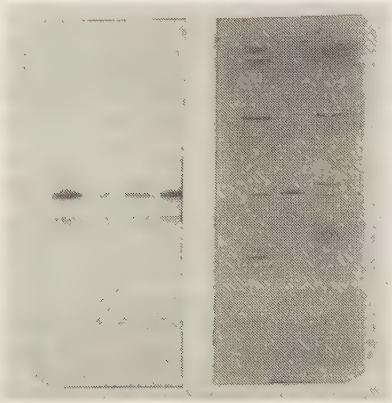


Abbildung 18:
Isoelektrische Fokussierung der Octopindehydrogenase.
links: Anfärbung der Octopindehydrogenaseaktivität;
O = gereinigte ODH,
Re = Rohextrakt des Retraktors,
L = Rohextrakt der Längsmuskulatur.
rechts: Proteinfärbung;
S = pH-Marker-Proteine.

auch Strombindehydrogenase enthielt. Abbildung 18 zeigt, daß bei einem pH-Gradienten von 4 - 6.6 nur die Octopindehydrogenase nativ eluiert wird. Möglicherweise wird die Strombindehydrogenase in der Nähe ihres isoelektrischen Punktes denaturiert, da sich auch nach anschließendem Spülen der Säule mit 500 mM NaCl keine Strombindehydrogenaseaktivität im Eluat nachweisen ließ. Entsprechend gelang es ebenfalls nicht, die Enzymaktivität der partiell gereinigten Strombindehydrogenase (nach Ionenaustauschchromatographie) nach der isoelektrischen Fokussierung auf dem Gel sichtbar zu machen. Die Ergebnisse der Anionenaustauschchromatographie deuten darauf hin, daß der isoelektrische Punkt der Strombindehydrogenase unterhalb des isoelektrischen Punkts der Octopindehydrogenase liegt, da letztere bei niedrigeren Salzkonzentrationen eluiert.

c) pH-Optimum und Puffereffekt

Um das pH-Optimum der Kondensationsreaktion (Hinreaktion) der gereinigten Enzyme zu bestimmen, wurden drei verschiedene Puffersubstanzen mit überlappenden pH Bereichen verwendet: Piperazin, Imidazol und Tris. Die Aktivität der ODH mit L-Arginin als Substrat zeigt ein breites Optimum im Bereich von pH 6.2 - 7.5 (s. Abbildung 19). Das gleiche gilt für die Reaktion dieses Enzyms mit Glycin und L-Alanin, jedoch ist mit diesen Substraten eine starke Aktivierung des Enzyms durch Imidazol als Puffersubstanz zu beobachten (s.u.). Die Reaktion der Strombindehydrogenase zeigt diesen ausgeprägten Puffereffekt nicht, das pH Optimum liegt, ähnlich wie das der Octopindehydrogenase, für alle drei Substrate im Bereich von pH 6.0 - 7.2. In der Rückreaktion mit Octopin bzw. Strombin als Substrat zeigen beide Enzyme die höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten oberhalb von pH 8.5.

Der Einfluß der Puffersubstanz auf die Reaktionsgeschwindigkeit der ODH mit verschiedenen Aminosäuren wurde bei einem pH-Wert von 7.0 überprüft. Tabelle 9 zeigt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit mit Alanin und Glycin in Imidazolpuffer,

der normalerweise für die Aktivitätsbestimmung verwendet wurde, etwa 5 - 20 mal höher ist, als in anderen Puffersystemen. Die Aktivität mit Arginin wird dagegen nur wenig beeinflußt.

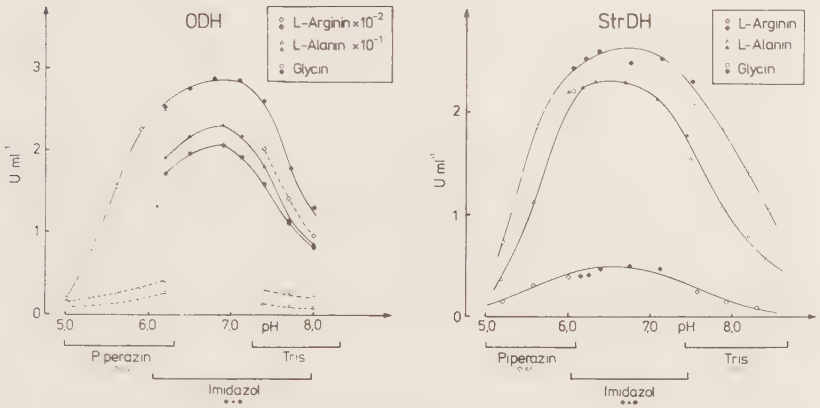


Abbildung 19: Bestimmung des pH-Optimums gereinigter Octopindehydrogenase (links) und gereinigter Strombindehydrogenase (rechts); Aktivität mit verschiedenen Aminosäuren in verschiedenen Puffern. Gestrichelte Kurven links unten: Aktivität der Octopindehydrogenase mit Alanin und Glycin in Piperazin- bzw. Tris-Puffer.

Tabelle 9: Aktivität der Octopindehydrogenase aus S. nudus mit L-Arginin, L-Alanin und Glycin bei pH 7.0 in Gegenwart verschiedener Puffersubstanzen. Angaben in % der Aktivität mit L-Arginin.

Puffer	% Aktivität L-Arginin	L-Alanin	Glycin
Imidazol/HCl	100	100	100
K-Phosphat	98	9	20
HEPES/HCl	102	3	3
TRA/NaOH	92	12	15
bis-Tris	94	4	2

d) Substrataffinität

Die kinetischen Eigenschaften der Opindehydrogenasen, vor allem die der Octopindehydrogenase, wurden vielfach als regulatorische Parameter der Opinbildung diskutiert. Eine Bestimmung der Substrataffinitäten der gereinigten Octopin- und Strombindehydrogenase sollten zeigen, ob Unterschiede zwischen den beiden Enzymen bestehen, die möglicherweise eine Erklärung für den Dualismus der anaeroben Endproduktbildung in S. nudus bieten.

Die apparenten Michaeliskonstanten der beiden Enzyme sind in Tabelle 10 und 11 aufgeführt. Die K_m-Werte der Octopindehydrogenase für die drei Aminosäuresubstrate diffferieren um mehr als das 200fache. Eindeutig bevorzugtes Substrat ist L-Arginin mit einem apparenten K_m-Wert von 2.7 mM, die K_m-Werte für Alanin und Glycin betragen dagegen 492 bzw. 660 mM. In der octopinbildenden Reaktion erreicht das Enzym bei Pyruvatkonzentrationen von 1.2 mM die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit. Unterhalb dieses Wertes nimmt sowohl die Affinität für L-Arginin als auch die apparente Maximalgeschwindigkeit ab. Bei sättigenden Konzentrationen beider Substate beträgt der apparente K_m-Wert für NADH 32 uM. Die aus diesen Daten berechneten absoluten K_m-Werte für Pyruvat und Arginin betragen 0.6 bzw. 1.9 mM.

Die Maximalgeschwindigkeit der Rückreaktion mit Octopin beträgt nur 9 % der Geschwindigkeit der Hinreaktion, der K_m für dieses Substrat liegt bei 0.6 mM. Die Rückreaktion mit Strombin ließ sich nicht, die mit Alanopin nur in sehr geringem Umfang, nachweisen.

Die Strombindehydrogenase (Tabelle 11) zeigt für die Substrate, die allen Dehydrogenasen gemeinsam sind, ähnliche Affinitäten wie die Octopindehydrogenase. Der K_m für Pyruvat ist identisch, die Affinität für NADH liegt um den Faktor 1.7 über, die für NAD^+ um den Faktor 2.6 unter der der ODH. Die K_m-Werte für Glycin und L-Alanin sind mit 58 und 105 mM

Tabelle 10: Apparente K_m-Werte und Maximalgeschwindigkeiten der Octopindehydrogenase aus S. nudus.

ODH

Substrat	Cosubstrat	K_m (mM)	V_{max} (U/mg Protein)
L-Arginin (0.4 - 4.0 mM)	10 mM Pyruvat 0.25 mM NADH	2.7	574
L-Arginin (0.4 - 4.0 mM)	1 mM Pyruvat 0.25 mM NADH	5.2	353
L-Arginin (0.4 - 4.0 mM)	0.5 mM Pyruvat 0.25 mM NADH	6.9	252
L-Arginin (0.4 - 4.0 mM)	0.25 mM Pyruvat 0.25 mM NADH	8.9	172
L-Alanin (30 - 190 mM)	10 mM Pyruvat 0.25 mM NADH	492	121
Glycin (17 - 190 mM)	10 mM Pyruvat 0.25 mM NADH	660	12
Pyruvat (0.4 - 4.0 mM)	10 mM L-Arginin 0.25 mM NADH	1.2	400
NADH (0.015 - 0.200 mM)	10 mM L-Arginin 10 mM Pyruvat	0.032	409
100 mM Imidazol/HCl pH 7.0			
Octopin (0.2 - 2.0 mM)	5 mM NAD^+	0.6	53
Alanopin (30 mM)	5 mM NAD^+	/	(<0.1)
Strombin (20 - 50 mM)	5 mM NAD^+	/	(<0.01)
NAD^+	5 mM Octopin	0.046	60
100 mM Tris/HCl pH 8.7			

Tabelle 11: Apparente K_m-Werte und Maximalgeschwindigkeiten der Strombindehydrogenase aus *S. nudus*.

	STRDH		
Substrat	Cosubstrat	K_m (mM)	V_{max} (U/mg Protein)
Glycin (10 - 180 mM)	9 mM Pyruvat 0.22 mM NADH	58	122.7
L-Alanin (10 - 300 mM)	9 mM Pyruvat 0.22 mM NADH	105	118.5
L-Arginin (0.5 - 5.5)	9 mM Pyruvat 0.22 mM NADH	2.7	50.0
Pyruvat (0.2 - 4.0 mM)	200 mM Glycin 0.22 mM NADH	1.2	126.2
NADH (0.008 - 0.075 mM)	200 mM Glycin 9 mM Pyruvat	0.019	110.8
100 mM Imidazol/HCl pH 7.0			
Strombin (2 - 20 mM)	5 mM NAD^+	12.8	16.2
Alanopin (0.6 - 10 mM)	5 mM NAD^+	2.3	12.8
Octopin (0.2 - 2 mM)	5 mM NAD^+	0.6	2.8
NAD^+ (0.04 - 0.3 mM)	25 mM Strombin	0.12	7.2
100 mM Tris/HCl pH 8.7			

jedoch wesentlich niedriger als die der ODH, der K_m-Wert für L-Arginin ist identisch. Die höhere Affinität der Strombindehydrogenase für L-Alanin und Glycin stimmt mit dem Befund überein, daß sich mit diesem Enzym auch die Rückreaktion nachweisen läßt, die Reaktionsgeschwindigkeit beträgt 13 % der Geschwindigkeit der Hinreaktion. Der apparente K_m-Wert für Strombin ist allerdings mit 12.8 mM sehr viel höher als der für Octopin.

Im Hinblick auf den Dualismus der anaeroben Endproduktbildung lassen sich die Ergebnisse der Enzymuntersuchungen wie folgt zusammenfassen: Die Kapazität der glykolytischen Endproduktbildung im Muskelgewebe ist, gemessen an den Maximalaktivitäten der Opindehydrogenasen, für die Octopinbildung sehr viel größer als für die Strombinbildung. Die Endproduktbildung kann von verschiedenen Enzymproteinen katalysiert werden, die sich vor allem in ihren Affinitäten gegenüber den Aminosäuren Glycin und Alanin unterscheiden. In den Affinitäten für Pyruvat und NADH bestehen nur geringfügige Unterschiede.

3.3 Parameter der Pyruvatreduktasereaktion bei funktionsbedingter und biotopbedingter Anaerobiose

Siegmund (1986) untersuchte verschiedene Spezies mariner Invertebraten und fand, daß nach biotopbedingter Anaerobiose das Verhältnis des Gewebegehaltes eines Opins zum Gewebegehalt der korrespondierenden Aminosäure für die Octopin- und die Strombindehydrogenasereaktion identisch ist. Nach einer funktionsbedingten Anaerobiose weichen diese Verhältniswerte jedoch erheblich voneinander ab. Er kam zu der Schlußfolgerung, daß bei biotopbedingter Anaerobiose alle Dehydrogenasen nahe ihrem Reaktionsgleichgewicht katalysieren, so daß die Aminosäure Konzentration die Art des vorwiegend gebildeten Endprodukts bestimmt. Bei funktionsbedingter Anaerobiose können jedoch nur solche Dehydrogenasen ihr Reaktionsgleichgewicht einstellen, die in hohen Aktivitäten im Gewebe vor-

handen sind. Für den Introvertretraktor mit hoher Octopin- und niedriger Strombindehydrogenaseaktivität würde das bedeuten, daß funktionsbedingt nur die Octopindehydrogenase, biotopbedingt aber beide Dehydrogenasen im Gleichgewicht sind.

Um diese Hypothese zu prüfen wurden in einem dritten Versuchskomplex die Gehalte aller an den Opindehydrogenasereaktionen beteiligten Metabolite sowie der intrazelluläre pH nach isometrischer Kontraktion und mehrstündiger Hypoxie bestimmt bzw. abgeschätzt. Zum Vergleich mit den Metabolitverhältnissen im Muskel in vivo wurde die Gleichgewichtskonstante der Reaktion in vitro bestimmt.

3.3.1 Opin-, Aminosäure-, Pyruvat-, NADH und NAD^+-Gehalte bei Aktivität und Hypoxie

Ausgangspunkt der "Gleichgewichtshypothese" war ein Vergleich der Konzentrationsverhältnisse der Aminosäuren und der korrespondierenden Opine nach biotopbedingter und funktionsbedingter Anaerobiose (Siegmund, 1986; s.o.). Für den Introvertretraktor von S. nudus sollte in diesem Versuch vor allem auch die Konzentration derjenigen Reaktanden bestimmt werden, die allen Opindehydrogenasereaktionen gemeinsam sind: Pyruvat, NAD^+ und NADH. Bei Kenntnis der Konzentrationen aller Reaktanden läßt sich prüfen, ob auch die Quantität der Opinbildung bei funktionsbedingter und biotopbedingter Anaerobiose mit den postulierten Regulationsmechanismen im Einklang steht.

Vergleichend wurden isometrisch unter Normoxie kontrahierende Muskeln, und ruhende Muskeln unter bis zu 10 h Hypoxie untersucht. Da die Verhältnisse der Metabolitkonzentrationen in das Reaktionsgleichgewicht eingehen, wurden neben Pyruvat-, NAD^+ und NADH-Gehalten auch die Aminosäure- und Opingehalte der Muskeln bestimmt, obwohl für diese Metabolite bereits Daten vorlagen (s. 3.1).

Tabelle 12 zeigt die Gehalte der Reaktionspartner der Octopin- und der Strombindehydrogenasereaktion. Der Gehalt der Aminosäuren und Opine zeigt die bereits unter 3.1 beschriebenen Veränderungen. Der Octopingehalt steigt bei Aktivität linear bis auf 3.7 umol/g FG, bei Hypoxie jedoch nur geringfügig auf 0.14 umol/g FG, Strombin akkumuliert nur unter Hypoxie. Der Arginingehalt steigt, ausgehend von 2.6 bzw 2.4 umol/g FG, in beiden Situationen an und erreicht bei Aktivität 14.8 umol/g FG, bei Hypoxie jedoch nur 7.7 umol/g FG. Der Glycingehalt liegt gleichbleibend bei 240 bzw. 220 umol/g FG und übertrifft damit den Arginingehalt um das 16 - 90fache.

Tabelle 12: Parameter der Pyruvatreduktasereaktionen. Metabolitgehalt des Introvertretraktors (umol/g FG, *nmol/g FG) nach bis zu einstündiger isometrischer Kontraktion (Aktivität) mit einer Frequenz von 0.1 Hz sowie nach bis zu 10 h Inkubation unter hypoxen Bedingungen (Hypoxie). n >/= 5; NADH n >/= 7, Glycin n = 4.

AKTIVITÄT			HYPOXIE		
min	Octopin	Strombin	h	Octopin	Strombin
0	0.06 ±0.03	0.58 ±0.26	0	0.031 ±0.014	0.48 ±0.26
20	1.23 ±0.74	0.81 ±0.30	2.5	0.105 ±0.060	0.60 ±0.10
40	2.32 ±0.85	0.64 ±0.35	5	0.106 ±0.185	0.57 ±0.14
60	3.71 ±1.78	0.75 ±0.43	7.5	0.185 ±0.124	0.71 ±0.24
			10	0.138 ±0.044	1.34 ±0.48
min	L-Arginin	Glycin	h	L-Arginin	Glycin
0	2.6 ±0.7	252 ±10	0	2.4 ±1.4	234 ±21
20	13.3 ±1.7	248 ±38	2.5	6.4 ±1.1	216 ±23
40	16.1 ±1.9	265 ±31	5	6.2 ±2.1	232 ±55
60	14.8 ±2.8	240 ±39	7.5	8.8 ±1.6	217 ±21
			10	7.7 ±1.4	216 ±23
min	Pyruvat*	NADH*	h	Pyruvat*	NADH*
0	43 ±13	1.8 ±0.6	0	42 ±17	1.4 ±0.5
20	115 ±39	3.1 ±0.9	2.5	50 ±24	2.5 ±0.5
40	169 ±63	3.6 ±0.9	5	42 ±17	2.0 ±0.5
60	210 ±78	3.8 ±1.0	7.5	50 ±20	2.1 ±0.5
			10	51 ±13	2.2 ±0.7
min	NAD^{+}*	NAD^{+}/NADH	h	NAD^{+}*	NAD+/NADH
0	51 ±16	28	0	59 ± 7	42
20	49 ±13	16	2.5	59 ±10	24
40	54 ± 8	15	5	59 ±11	31
60	63 ±12	17	7.5	50 ± 6	24
			10	70 ± 4	32

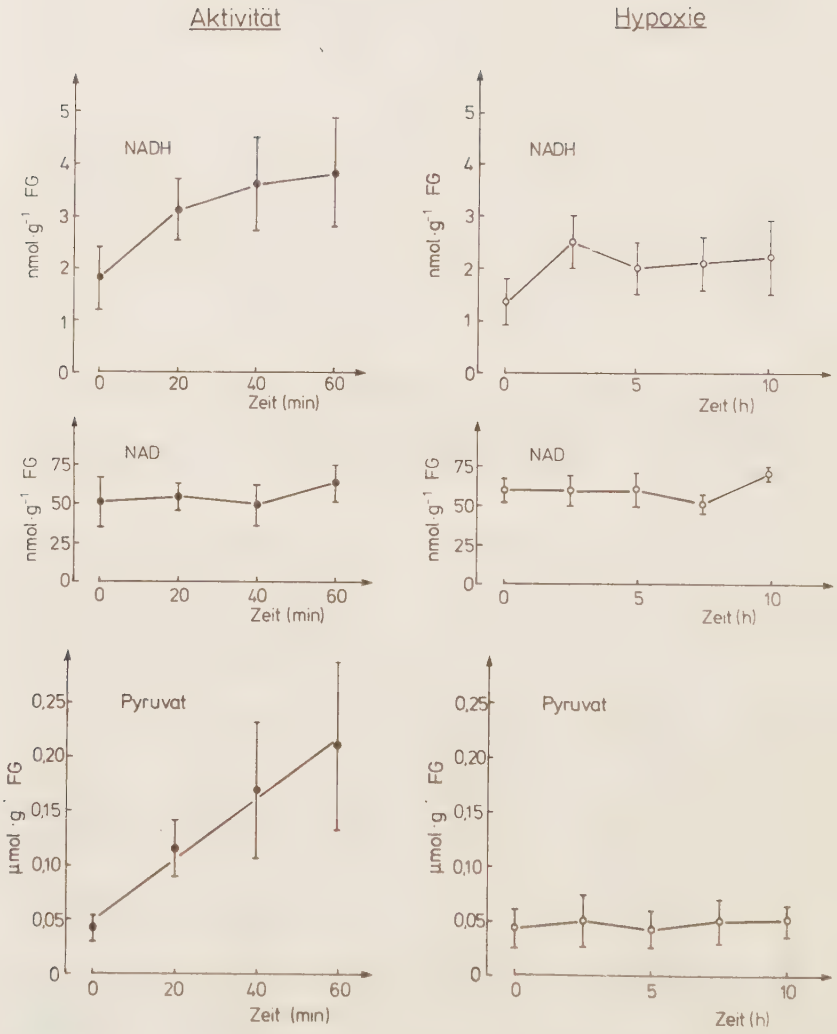


Abbildung 20: NADH-, NAD^+- (nmol/g FG) und Pyruvat- (umol/g FG) Gehalte des Introvertretraktors bei Aktivität (Kontraktionsfrequenz 0.1 Hz) und Hypoxie (Inkubation in stickstoffbegastem Seewasser).

In den gemeinsamen Substraten der Octopin- und der Strombindehydrogenasereaktion besteht vor allem für den Pyruvatgehalt ein deutlicher Unterschied zwischen Aktivität und Hypoxie (Abbildung 20). In kontrahierenden Muskeln steigt der Gehalt von 43 auf 210 nmol/g FG, während in hypoxen, ruhenden Muskeln auch nach 10 stündiger Inkubation keine Pyruvatakkumulation nachweisbar ist. Der NADH-Gehalt beträgt in ruhenden, normoxen Kontrollmuskeln 1.4 bzw. 1.8 nmol/g FG. Nach einer 20 minütigen Kontraktionsphase steigt der NADH-Gehalt auf 3.1 nmol/g FG und erreicht nach 60 min 3.8 umol/g FG. Bei Hypoxie zeigt sich ein initialer Anstieg des NADH-Gehaltes von 1.4 auf 2.5 nmol/g FG nach 2.5 h. Im weiteren Verlauf der Hypoxie nimmt der Gehalt wieder leicht ab und liegt zwischen 5 und 10 h bei 2.0 - 2.2 nmol/g FG. Der Gehalt von NAD^+ beträgt zwischen 50 und 70 nmol/g FG, was einem NAD^+/NADH-Verhältnis von 28 bzw. 40 in Kontrollmuskeln entspricht. Dieser Quotient sinkt sowohl bei Aktivität als auch unter Hypoxie um etwa 50 %.

Tabelle 13 zeigt die Gehalte einiger weiterer Metabolite, die nicht direkt an den Opindehydrogenasereaktionen beteiligt sind. Erwähnenswert sind vor allem Glycerin-3-Phosphat und Malat, deren Konzentrationen in kontrahierenden Muskeln innerhalb von 60 min auf das 8 bzw. 12 fache des Kontrollwertes steigen, während der Gehalt der hypoxen Muskeln nur auf das 2.5 bzw. 4 fache ansteigt. Der Anstieg des Succinatgehaltes in hypoxen Muskeln von 25 auf 188 nmol/g FG ist deutlich, jedoch quantitativ geringer als in der unter 3.1.4 beschriebenen Versuchsreihe.

Der Vergleich der beiden Anaerobiosesituationen zeigt, daß der quantitativ höheren Akkumulation des Octopins bei funktionsbedingter Anaerobiose auch ein stärker Anstieg der Edukte der Octopindehydrogenasereaktion, vor allem des Pyruvat- und des L-Argininggehaltes, entspricht.

Tabelle 13: Metabolite des anaeroben Energiestoffwechsels bei Aktivität und Hypoxie (umol/g FG; *nmol/g FG). n = 5; D/L-Alanin, Aspartat n = 4; PLA = Phospho-L-Arginin, Gly-3-P = L-Glycerin-3-Phosphat.

AKTIVITÄT			HYPOXIE		
min	PLA	Succinat*	h	PLA	Succinat*
0	25.2 ±6.0	33 ±13	0	32.5 ±3.7	25 ± 8
20	11.9 ±3.5	33 ± 9	2.5	33.6 ±8.2	80 ±29
40	9.8 ±1.5	49 ±15	5	32.1 ±6.1	120 ±29
60	11.7 ±1.7	56 ±10	7.5	28.1 ±4.6	186 ±37
			10	28.7 ±5.9	188 ±24

min	L-Aspartat	D,L-Alanin	h	L-Aspartat	D,L-Alanin
0	1.9 ±0.5	9.1 ±1.8	0	2.5 ±1.4	11.7 ±3.0
20	1.9 ±0.5	6.4 ±1.7	2.5	1.2 ±0.3	6.9 ±0.8
40	1.3 ±0.2	8.1 ±1.1	5	1.8 ±0.9	11.0 ±6.8
60	1.9 ±0.2	8.6 ±3.7	7.5	2.3 ±1.6	9.4 ±6.1
			10	1.2 ±0.2	9.5 ±4.2

min	Gly-3-P*	L-Malat*	h	Gly-3-P*	L-Malat*
0	35 ±14	31 ± 10	0	10 ± 5	20 ± 8
20	172 ±92	179 ± 90	2.5	33 ±18	45 ± 6
40	185 ±38	260 ± 73	5	29 ±20	54 ±16
60	264 ±56	384 ±124	7.5	35 ± 8	71 ±20
			10	25 ± 7	77 ±16

3.3.2 Bestimmung und Abschätzung des intrazellulären pH-Wertes

Nach der Reaktionsgleichung:

Pyruvat + Aminosäure + NADH + H^+ ⇌ Opin + NAD^+

hat auch die Protonenkonzentration einen Einfluß auf die Opinakkumulation. Eine Steigerung der Protonenkonzentration, d.h. ein Absinken des pH-Wertes, begünstigt die Opinbildung. Um alle Parameter des Reaktionsgleichgewichtes zu erfassen, müssen auch Änderungen des intrazellulären pH-Wertes der Muskeln berücksichtigt werden.

a) Bestimmung des pH_i mit der DMO-Methode

Diese Methode zur Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes setzt voraus, daß sich ^{14}C-markiertes DMO sowie zur Bestimmung des Extrazellulärraums verwendetes ^{3}H-Inulin inner-

halb der Versuchszeit gleichmäßig im ganzen Muskel verteilen. Um zu überprüfen, ob sich der pH_i des Muskels im Verlauf der Kontraktionsexperimente mit dieser Methode verläßlich bestimmen läßt, wurde zunächst die Einstromzeit der radioaktiven Substanzen bestimmt. In Abbildung 21 ist das Verhältnis $Q = [Inulin]_{Gewebswasser}/[Inulin]_{Medium}$, das ein Maß für den Extrazellulärraum ist, gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die untere Kurve (A) zeigt die Werte von Muskeln, die, wie in den Kontraktionsexperimenten, im Versuchsgefäß beträufelt wurden. Die obere Kurve (B) bezieht sich auf Muskeln, die ganz in das Medium eingetaucht waren.

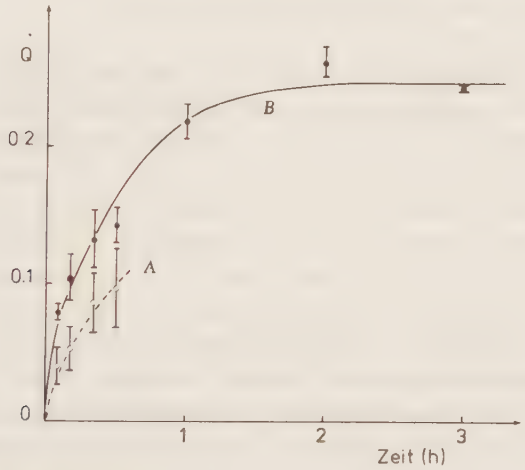


Abbildung 21: Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes mit der DMO-Methode. Berechnete Fraktion des Extrazellulärraumes ($Q = {}^3H$-Inulin (Gewebswasser)/^3H-Inulin (Medium)) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Kurve A: Muskeln mit Medium beträufelt; Kurve B: Muskeln ins Medium eingetaucht.

Die Auftragung macht deutlich, daß auch in solchen Muskeln, die ganz in das Medium eingetaucht sind, erst nach 1 h ein konstanter Wert des Extrazellulärraums, d.h. eine Sättigung mit ^3H-Inulin, erreicht wird. In Muskeln, die nur vom Medium beträufelt werden, erfolgt der Inulin-Einstrom noch sehr viel langsamer. Da die Kontraktionsexperimente bis zu maximal einer Stunde durchgeführt wurden, war diese Methode zur pH_i-Bestimmung kontrahierender Muskeln nicht geeignet. Auch

eine pH_i-Bestimmung durch Eintauchen der Muskeln in DMO/Inulin-Medium nach Versuchsende, wäre von Erholungseffekten überlagert worden. Anhand der Daten der Muskeln, die 1 - 3 h in DMO/Inulin-Medium inkubiert waren, konnte jedoch der pH_i ruhender Kontrollmuskeln bestimmt werden. Bei einem Extrazelluläranteil von Q = 0.240 ± 0.021 (n = 6) betrug der intrazelluläre pH 7.35 ± 0.11. Der mittlere Wassergehalt aller Versuchsmuskeln betrug 0.815 ± 0.011 ml/g FG (n = 31), daraus ergibt sich eine Zellwasserfraktion (W - Q) von 0.575 ml/g FG.

b) Berechnung des intrazellulären pH

Um trotz der Unzulänglichkeit der experimentellen pH_i-Bestimmung eine Abschätzung der pH-Veränderungen während Aktivität und Hypoxie zu erhalten, wurde unter der Voraussetzung, daß keine Protonen aus dem Medium aufgenommen oder ins Medium abgegeben werden, die Veränderung des intrazellulären pH nach Pörtner (1987) anhand der Veränderung der Metabilotkonzentrationen berechnet. Die berechneten intrazellulären pH-Werte der Muskeln aus Versuch 3.3.1 sind in Tabelle 14 aufgeführt. Als Kontrollwert wurde der experimentell an ruhenden normoxen Muskeln bestimmte Wert von 7.35 zugrunde gelegt. Ein mögliche Protonenakkumulation durch die Bildung flüchtiger Fettsäuren mußte unberücksichtigt bleiben, da die geringen Extraktvolumina eine Bestimmung dieser Metabolite erschweren.

Tabelle 14: Änderungen des intrazellulären pH-Wertes bei Aktivität und Hypoxie. Der Kontrollwert wurde experimentell bestimmt, die Werte für Aktivität (isometrische Kontraktion, 0.1 Hz) und Hypoxie (Inkubation in stickstoffbegastem Seewasser) wurden anhand der Veränderungen der Metabolitgehalte berechnet.

Zeit	Aktivität	Zeit	Hypoxie
0 min	7.35	0 h	7.35
20 min	7.38	2.5 h	7.32
40 min	7.35	5 h	7.35
60 min	7.25	7.5 h	7.39
		10 h	7.30

In kontrahierenden Muskeln ist nach 20 min eine leichte Alkalose, nach 60 minütiger Kontraktion eine leichte Acidose zu verzeichnen, der pH weicht jedoch um nicht mehr als 0.1 Einheit vom Kontrollwert ab. Eine Schwankung um maximal 0.5 pH-Einheiten um den Kontrollwert, mit einer leichten Acidose nach 10 h wurde für Muskeln berechnet, die unter hypoxen Bedingungen inkubiert wurden.

3.3.3 Apparente Gleichgewichtskonstante der Octopin- und der Strombindehydrogenasereaktion

Die Gleichgewichtskonstante einer Reaktionen gibt das Verhältnis der Edukte und Produkte im thermodynamischen Gleichgewicht an. Um die gemessenen Metabolitkonzentrationen mit diesem Wert vergleichen zu können wurde die apparente Gleichgewichtskonstante

$$K'_{eq} = \frac{[\text{Pyruvat}] \cdot [\text{Aminosäure}] \cdot [\text{NADH}] \cdot [H^+]}{[\text{Opin}] \cdot [\text{NAD}^+]}$$

der Octopin- und der Strombindehydrogenasereaktion in vitro mit Hilfe gereinigter Octopin- und Strombindehydrogenase bestimmt. Für die Strombindehydrogenasereaktion wurde ein Wert von $0.50 \pm 0.24 \cdot 10^{-13}$ M^2 ($n = 4$), für die Octopindehydrogenase ein Wert von $2.95 \pm 0.05 \cdot 10^{-13}$ M^2 ($n = 3$) ermittelt.

4. DISKUSSION

Wollte man den eingangs vorgestellten Radfahrer tatsächlich dazu bewegen, seine Fahrt nach Köln unter Sauerstoffausschluß anzutreten, so würde er wohl weder den Kölner Dom noch die Düsseldorfer Südbrücke zu Gesicht bekommen, da er als Gesamtorganismus nicht an hypoxe Bedingungen angepaßt ist. Ein mariner Wirbelloser wie der Spritzwurm Sipunculus nudus kann dagegen bis zu zwei Tagen unter Sauerstoffausschluß überleben (Pörtner et al., 1984a); selbst unter extrem hypoxen Bedingungen ist er noch fähig, sich grabend fortzubewegen (Körner, 1985).

Wenn auch der Radfahrer als Gesamtorganismus eine stark ausgeprägte Hypoxie nicht toleriert, so gewinnt er dennoch Energie aus dem anaeroben Stoffwechsel. Ein Teil der Glukose, die er auf seinem Weg nach Köln verbraucht, wird zunächst von der Muskulatur zu Laktat oxidiert, das dann aber dem Herzen und der Niere als Substrat der aeroben Energiegewinnung dienen kann.

Schon lange vermutete man, daß der Stoffwechselweg der anaeroben Glykolyse, der bei den Vertebraten zum Laktat führt, auch für die Anaerobiosetoleranz vieler Invertebraten von Bedeutung ist. Der schlüssige Beweis scheiterte jedoch in vielen Fällen daran, daß sich weder bei Aktivität noch bei Hypoxie eine Laktatakkumulation nachweisen ließ. Dieses Problem löste sich, als deutlich wurde, daß in den Muskeln vieler mariner Invertebraten nicht Laktat das Endprodukt der anaeroben Glykolyse ist, sondern Kondensationsprodukte von Pyruvat und einer Aminosäure, die "Opine" (Grieshaber & Gäde, 1976; Collicut & Hochachka, 1977; Gäde & Grieshaber, 1986; Gäde, 1987).

Nachdem man eine ganze Reihe verschiedener Endprodukte in marinen Invertebraten identifiziert hatte, kam in den letzten Jahren ein neuer Aspekt in die Diskussion: Die Frage nach der Regulation und der Bedeutung des Phänomens, daß in vielen Spezies nicht ein bestimmtes Opin das universelle

glykolytische Endprodukt ist, sondern daß in unterschiedlichen physiologischen Situationen unterschiedliche glykolytische Endprodukte gebildet werden.

Der isolierte Introvertretraktor des Spritzwurms Sipunculus nudus erwies sich als geeignetes Objekt, die Regulation dieses Dualismus der anaeroben Endproduktbildung zu untersuchen. Im Folgenden sollen zunächst die allgemeinen Charakteristika der anaeroben Energiegewinnung dieses Muskels mit seinen verschiedenen Möglichkeiten der anaeroben ATP-Produktion erläutert werden. Der zweite Teil ist dann der Regulation der glykolytischen Endproduktbildung gewidmet. Es sollen Evidenzen für eine Hypothese präsentiert werden, die den Dualismus der anaeroben Endproduktbildung anhand der Eigenschaften der Opindehydrogenasereaktionen und der sie katalysierenden Enzyme erklärt. Der letzte Abschnitt stellt einige Spekulationen zur Evolution der Vielfalt von anaeroben Endprodukten vor.

4.1 Funktionsbedingte Anaerobiose unter Normoxie und Hypoxie

Die verschiedenen Wege der anaeroben ATP-Produktion wurden zunächst am Beispiel der funktionsbedingten Anaerobiose untersucht, da sich die grundsätzlichen Eigenschaften eines energieliefernden Stoffwechselweges am deutlichsten offenbaren, wenn er maximal beansprucht wird.

4.1.1 Die aerobe Energiegewinnung

Ein isolierter isometrisch kontrahierender Introvertretraktor entwickelt eine Maximalkraft von etwa 10 g, bei einer Kontraktionsfrequenz von 1/10 Hz nach einer Stunde oder 360 Kontraktionen jedoch nur noch eine Kraft von etwa 0.2 g (s. Abbildung 10, S. 48). Diese schnelle Ermüdung sowie ein geringer Mitochondriengehalt (Reger,1964; Greven & Grieshaber, unveröffentlicht) und eine ausgeprägte anaerobe Energiegewinnung aus dem Phosphagenabbau und der anaeroben Gly-

kolyse lassen vermuten, daß auch unter normoxen Bedingungen ein großer Teil der benötigten Energie auf anaerobem Wege bereitgestellt wird.

Aus dem Sauerstoffverbrauch läßt sich für den ruhenden Retraktor ein aerober ATP-Umsatz von 3.36 umol/g·h berechnen (s. Tabelle 4, S. 54). Sofern nicht regulatorische Prozesse den aeroben Stoffwechsel bei Aktivität "abschalten", bedeutet das, daß auch kontrahierende Muskeln unter normoxen Bedingungen mindestens 3.36 umol ATP/g FG·h aus dem aeroben Stoffwechsel gewinnen. Bei einer aktivitätsbedingten Steigerung des Sauerstoffverbrauchs könnte dieser Wert nur noch größer werden.

Eine direkte Messung des Sauerstoffverbrauchs kontrahierender Muskeln war aus methodischen Gründen nicht möglich (s. 2.3). Ein Vergleich der Energieproduktion von Muskeln, die unter Normoxie kontrahierten, mit dem von Muskeln, die unter Hypoxie kontrahierten, erlaubt jedoch eine Abschätzung des aeroben Anteils an der Energieproduktion. Die anaeroben ATP-Bildungsraten lassen sich aus den Metabolitveränderungen berechnen. Die Stöchiometrie der ATP-Bildung beträgt 1 : 1 für den Abbau des Argininphosphats, 1 : 1.5 für die Octopinbildung und 1 : 2.5 für die Succinatbildung (Pörtner, 1982).

Will man die anaeroben ATP-Bildungsraten normoxer und hypoxer Muskeln direkt vergleichen und aus der Differenz den aeroben Anteil berechnen, so müssen jedoch folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Hypoxe Muskeln dürfen nicht auch ATP auf aerobem Wege bereitstellen, da dies zu einer Unterschätzung des Gesamtumsatzes dieser Muskeln führen würde.

Pörtner (1982) konnte jedoch zeigen, daß der O_2-Verbrauch isolierter Muskulatur bei Partialdrucken unter 5 Torr, wie sie unter hypoxen Bedingungen im Versuchsgefäß gemessen wurden (s. 2.3.3), höchstens 10 % des Verbrauchs unter Normoxie beträgt. Im vorliegenden Fall würde dies die Ge-

samt-ATP-Produktion der hypoxen Muskeln um weniger als 2 % erhöhen, daher sollen die ATP-Bildungsrate unter Hypoxie als Gesamt-ATP-Umsatz der hypoxen Muskeln zugrunde gelegt werden.

2. Eine Berechnung des aeroben Anteils an der Energieproduktion aus der Differenz der anaeroben ATP-Bildungsraten setzt voraus, daß die Muskeln unter beiden Bedingungen auch den gleichen Energieverbrauch aufweisen.

Da sich die Kraftamplituden der Muskeln unter Normoxie und unter Hypoxie nur geringfügig unterscheiden (s. Abbildung 10, S. 48), kann man davon ausgehen, daß auch der ATP-Umsatz in der gleichen Größenordnung liegt.

Abbildung 22 (S. 88) zeigt die anaeroben ATP-Bildungsraten bei der isometrischen Kontraktion unter Normoxie und Hypoxie. In den ersten 20 min der Aktivität, d.h. während der ersten 120 Kontraktionen gewinnen normox kontrahierende Muskeln etwa 50 umol ATP/g FG·h aus dem anaeroben Stoffwechsel. Hypox kontrahierende Muskeln gewinnen 59 umol/g FG·h.

Der größte qualitative Unterschied zwischen normoxen und hypoxen Muskeln im anaeroben Energiestoffwechsel besteht in der Akkumulation des Succinats (s. Abbildung 11, S. 49). Es liegt daher nahe, die Differenz in der anaeroben Energieproduktion im höheren Beitrag der Succinatgärung zu vermuten. Abbildung 22 zeigt jedoch, daß dieser Stoffwechselweg nur in geringem Umfang (0.1 - 6 %) an der anaeroben Energieproduktion beteiligt ist. In den ersten 20 min macht der Phosphagenabbau sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie mehr als 80 % der Gesamt-ATP-Produktion aus. Der Unterschied der ATP-Bildungsraten in diesem Zeitraum kommt vor allem durch eine etwas höhere Rate des Phosphagenabbaus der hypoxen Muskeln zustande.

Die Differenz beträgt 9 umol/g FG·h. Geht man davon aus, daß hypoxe und normoxe Muskeln etwa den gleichen ATP-Umsatz aufweisen, so macht der Anteil der aeroben Energiebereit-

stellung in den ersten 20 min etwa 15 % des Gesamtumsatzes aus. Geht man davon aus, daß normoxe Muskeln etwa 10 % mehr ATP verbrauchen als hypoxe, da ihre Kraftamplitude etwas höher ist, so erhöht sich der aerobe Anteil auf 23 %.

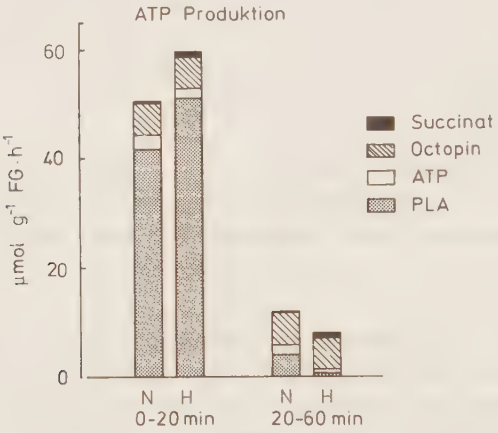


Abbildung 22: Anaerobe ATP-Bildungsraten (umol/g FG·h) isometrisch kontrahierender Introvertretraktoren (Kontraktionfrequenz 0.1 Hz) unter Normoxie (N) und Hypoxie (H). Für verschiedene Zeitintervalle wurden die mittleren ATP-Bildungsraten anhand der Veränderungen des Succinat-, Octopin-, ATP- und Phospho-L-Argininggehaltes (PLA) berechnet. Unterschiedliche Schraffuren geben die Anteile der einzelnen Stoffwechselwege an.

Um 9 umol ATP/g FG·h auf aerobem Wege bereitzustellen, müssen die Muskeln ihren Sauerstoffverbrauch etwa verdreifachen. Durch Inkubation ruhender Muskeln mit 2,4-Dinitrophenol ließ sich durch Entkopplung der Atmungskette der O_2-Verbrauch der Muskeln allerdings nur um 60 - 70 % steigern. Es ist jedoch fraglich, ob diese unphysiologische Stimulation der Sauerstoffaufnahme tatsächlich ein Maß für den maximalen O_2-Verbrauch ist. Muskelzellen in den äußeren Bezirken des Gewebes könnten schon abgestorben sein, bevor das Dinitrophenol in die inneren Bereiche diffundiert ist.

Faßt man die obigen Erörterungen zusammen und berücksichtigt dabei auch die hohe Streuung in den Metabolitgehalten, so kann man für den aeroben Anteil der Energiegewinnung der ersten 20 min der Aktivität einen Wert zwischen 10 und 30 %

des Gesamtumsatzes angeben. Dies entspräche einer Verdreifachung bis Vervierfachung des O_2-Verbrauchs gegenüber dem Ruhewert.

Dieser aerobe Anteil ist mit Befunden von Thompson et al. (1980) vergleichbar, die für die Muschel Placopecten magellanicus einen aeroben Anteil der Energieproduktion während des Fluchtschwimmens des Tieres von 30 % angeben. Die Autoren bestimmten für den Adduktormuskel während dieser Fluchtbewegungen einen O_2-Verbrauch von 8.1 umol/g FG·h. Dieser Wert entspricht einer Verdopplung des Ruheverbrauchs (4.0 umol/g·h). Pörtner (1982) gibt für S. nudus für einmaliges Eingraben einen aeroben Anteil von 25 % an. Meinardus-Hager (1986) bestimmte eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs der Herzmuschel C. tuberculatum nach unterschiedlicher Anzahl von Fluchtsprüngen um den Faktor 2.6 - 3.5.

Für einen überwiegenden Anteil anaerober Prozesse an der ATP-Produktion bei hohem Energieumsatz spricht auch der Befund, daß die anaerobe ATP-Produktion des Retraktors im Zeitraum von 20 bis 60 min auf 24 % des anfänglichen Wertes sinkt (s. Abbildung 22), und die Kraftentwicklung in diesem Zeitraum ebenfalls sehr gering ist (unter 20 % des Maximalwertes, s. Abbildung 10, S 48). Dieser Zusammenhang zeigt, daß weder die aerobe Energieproduktion noch die anaerobe Glykolyse in der Lage sind, ausreichend ATP für einen hohen Energieumsatz (eine hohe Kraftentwicklung) bereitzustellen. Der Nachweis, daß ein Rückgang der Energieproduktion die einzige Ursache für den Rückgang der Kraftentwicklung ist, müßte allerdings auf anderem Wege erbracht werden.

Im Zeitraum zwischen 20 und 60 min sind die Phosphagenreserven weitgehend erschöpft. In dieser Zeit gewinnen normoxe Muskeln, bei niedriger Kraftentwicklung, 11.8 umol/g FG·h, hypoxe Muskeln jedoch nur 7.9 umol ATP/g FG aus dem anaeroben Stoffwechsel. Nimmt man an, daß der aerobe Anteil der Energieproduktion über den Versuchszeitraum konstant ist, so kommt man zu dem Ergebnis, daß normoxe Muskeln in dieser Zeit mehr als doppelt soviel ATP (11.8 + 9 = 21.8 umol/g

FG·h) produzieren wie hypoxe (7.9 umol/g FG). Selbst wenn man den aeroben Ruheverbrauch von ATP zugrunde legt (11.8 + 3.4 = 15.2 umol/g FG), so ist der ATP-Verbrauch normoxer Muskeln höher als der hypoxer. Ob dies z.B. durch eine hypoxiebedingte Reduktion des Grundstoffwechsels (s. 4.2.1) bedingt ist, läßt sich anhand dieses Versuches nicht klar entscheiden. Möglicherweise wirken sich auch die geringen Unterschiede in der Kraftentwicklung in diesem Zeitraum stärker aus. Ein Hinweis auf eine Stoffwechselreduktion ließe sich aus dem Energieverbrauch der Muskeln ableiten, die für eine Stunde ruhend inkubiert wurden (s. Tabelle 2, S. 51). Diese Muskeln müßten, wenn sie den gleichen ATP-Umsatz zeigten wie normoxe Muskeln etwa 3.4 umol ATP auf anaerobem Wege bereitstellen. Die Daten zeigen zwar eine tendenzielle Erhöhung des Octopin und Succinatgehaltes jedoch keine Metabolitveränderungen, mit denen sich quantitativ eine ATP-Produktion von 3.4 umol/g FG·h erklären ließe. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß ein Argininphosphatabbau durch die hohen Schwankungen des Phosphagengehaltes verdeckt wird.

Die geschilderten Zusammenhänge zeigen, daß bei hohem Energieumsatz die Kapazität der anaeroben Energiegewinnung die der mitochondrialen ATP-Produktion weit übersteigt. Unter hypoxen Bedingungen kann die fehlende aerobe ATP-Produktion weitgehend durch einen verstärkten Phosphagenabbau kompensiert werden, die Kraftentwicklung des Muskels wird durch die Hypoxie kaum beeinflußt.

4.1.2 Das Phosphagen

Die Energie für eine hohe Kraftentwicklung zu Beginn der Kontraktionsphase wird zum größten Teil durch den Abbau des Argininphosphats bereitgestellt (s. Abbildung 22, S. 88). Wie eingangs ausgeführt, stellt das Phosphagen eine schnell mobilisierbare, aber limitierte Energiequelle dar. Über die Phosphagenkinase- und die Myokinasereaktion beeinflußt der Phosphagenspeicher die Konzentration aller drei Adenylate,

wobei aufgrund der Gleichgewichtslage der Reaktionen und der relativen Konzentrationen der Reaktanden ein Abbau des Phosphagens nur geringe Änderungen in der ATP-Konzentration zur Folge hat.

Dies soll in Abbildung 23 für das Arginin/Argininphosphatsystem des Introvertretraktors demonstriert werden. Die durchgezogenen Linien zeigen die anhand des Argininkinase- und des Myokinasegleichgewichts berechneten Veränderungen des Adenylatgehalts bei Abnahme des Argininphosphatgehaltes.

Der Vollständigkeit halber sei vorausgeschickt, daß diese "Simulation" nur dann eine Wiedergabe der physiologischen Verhältnisse im Introvertretraktor ist, wenn die Gleichgewichtskonstanten der Enzyme in vitro den in vivo Werten entsprechen und beide Reaktionen sich im Gleichgewicht befinden. NMR-Messungen der Reaktionsgeschwindigkeiten der Hin- und Rückreaktion der Creatinkinase im Vertebratenmuskel (Gadian et al. 1981) gaben allerdings Hinweise, daß sich die Verhältnisse im kontrahierenden Muskel ändern. Da jedoch entsprechende Messungen für die Argininkinase bisher noch nicht vorliegen, soll die Diskussion zunächst von dem ursprünglichen Konzept (Veech, 1978) ausgehen, daß beide Enzyme sich im Gleichgewicht befinden. Eine "aus dem Gleichgewicht geratene" Argininkinase würde eine Rechtsverschiebung der Kurven bewirken.

Für die rechnerische "Simulation" wurde ein Gesamt-Adenylatgehalt von 5 bzw. 3 umol/g FG und ein Gehalt von L-Arginin + L-Argininphosphat von 30 umol/g FG zugrunde gelegt, ferner geht die Berechnung davon aus, daß sich diese Summen bei Abnahme des Argininphosphatgehaltes nicht ändern. Die Konsequenzen einer Abnahme des Arginingehaltes durch die Bildung von Octopin werden gesondert diskutiert.

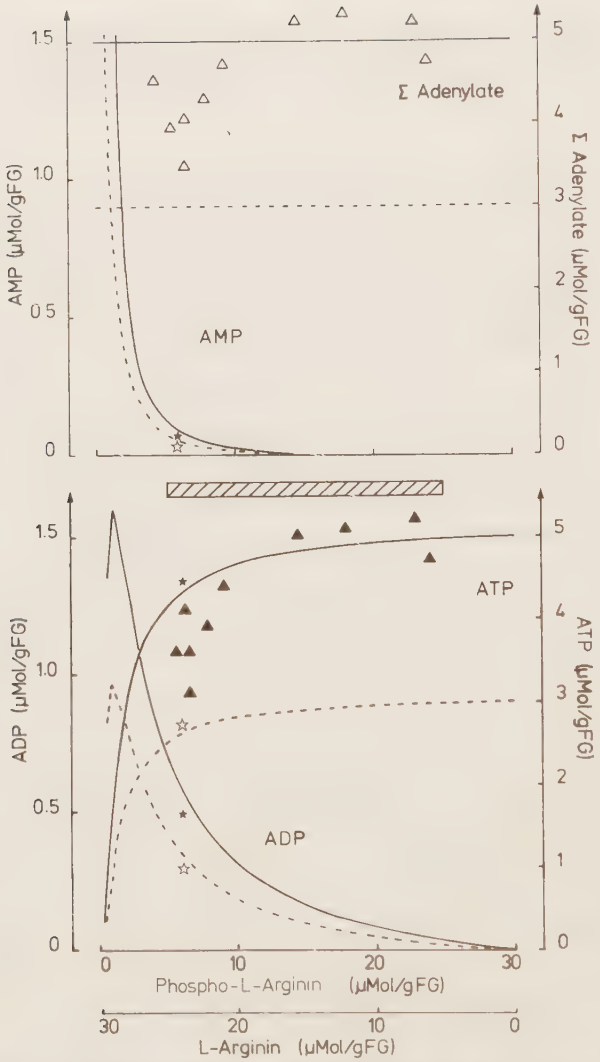


Abbildung 23: Theoretische Auswirkungen der Arginin- und der Myokinasereaktion auf den Gehalt an ATP, ADP (unteres Diagramm) und AMP (oberes Diagramm) im Introvertretraktor von S. nudus bei pH 7.35.
Berechnete Veränderungen des Adenylatgehaltes bei Abnahme des Phospho-L-Argininggehaltes (PLA + Arginin = 30 umol/g FG = const); zur Berechnung s. 2.14. Durchgezogenen Kurven: Gesamt-Adenylatgehalt = 5 umol/g FG; gestrichelten Kurven: Gesamtadenylatgehalt = 3 umol/g FG (s. oberes Diagramm). ▲ = ATP-Gehalt des Retraktors bei isometrischer Kontraktion. △ = Summe der Adenylate (gemessener ATP-Gehalt + berechneter ADP- und AMP-Gehalt) bei isometrischer Kontraktion. * = berechnete Adenylatgehalte bei Bildung von 4 umol/g FG Octopin; ausgefüllte Symbole: für 5 umol/g FG, offene Symbole für 3 umol/g FG Gesamt-Adenylatgehalt.
▨ = physiologischer Bereich des Phospho-L-Argininggehaltes.

Die durchgezogenen Linien wurden für einen Gesamt-Adenylatgehalt von 5 umol/g FG, die jeweils gestrichelten Kurven wurden für einen Adenylatgehalt von 3 umol/g FG berechnet. Die Differenz zwischen den beiden Kurven demonstriert den Effekt, den eine Änderung des Gesamt-Adenylatgehaltes z.B. durch Desaminierung von AMP zu IMP hat. Alle drei Metabolitgehalte verschieben sich bei Abnahme des Adenylatgehaltes zu niedrigeren Werten. Das ATP/ADP-Verhältnis ändert sich dabei nicht; für einen bestimmten Argininphosphatgehalt gilt nach dem Massenwirkungsgesetz: $ATP/ADP = K_{eq} \cdot PLA/(30-PLA)$.

Eine Änderung des Argininggehaltes durch Bildung von Octopin wirkt vor allem erniedrigend auf den ADP-Gehalt. Die mit (*) bezeichneten Punkte wurden unter der Annahme berechnet, daß 4 umol Octopin gebildet werden. Diese Reaktion wirkt im Gegensatz zur Desaminierung von AMP auch auf das ATP/ADP-Verhältnis. Es gilt dann: $ATP/ADP = K_{eq} \cdot PLA/(30-PLA-Oct)$, und das ATP/ADP-Verhältnis hängt damit auch vom Octopingehalt ab. Bei einem Gesamt-Adenylatgehalt von 3 umol/g FG beträgt das ATP/ADP-Verhältnis in der rechnerischen Simulation bei einem Argininphosphatgehalt von 6 umol/g FG 7.6. Wenn 4 umol Arginin mit Pyruvat zu Octopin kondensiert werden beträgt das Verhältnis 9.1.

Das ATP/ADP-Verhältnis steht zum einen mit dem Energy Charge (0.5 ADP + ATP)/(ATP + ADP + AMP) zum anderen mit der freien Energie der Hydrolyse des ATP $\triangle G_o' = \triangle G_o + R \cdot T \cdot \ln (ATP/ADP \cdot P_i)$ bzw. mit dem Phosphorylierungspotential $(ATP/ADP \cdot P_i)$ in Beziehung, die als stoffwechselregulierende Parameter diskutiert werden. (Atkinson, 1968; Nishiki et al., 1978). Vor allem dem Phosphorylierungspotential wird ein wichtiger Einfluß auf die ATP-verbrauchenden Prozesse z.B. die Muskelkontraktion zugeschrieben (Dawson et al. 1980; Kammermeyer et al, 1982).

Eine Erhöhung des ATP/ADP-Verhältnisses und damit des Phosphorylierungspotentials und des Energy Charge durch die Octopinbildung dürfte in vivo vor allem bei niedrigen Argininphosphatgehalten wirksam werden, da erst dann größere

Mengen an Octopin gebildet worden sind. Ob dieser Mechanismus eine entscheidende Bedeutung für den Stoffwechsel hat, oder ob er gegenüber anderen Mechanismen zurücktritt, läßt sich kaum entscheiden, da die direkten Effekte einer Änderung des ATP/ADP-Verhältnisses, für diesen Muskel quantitativ nicht faßbar sind.

Sehr deutlich illustriert Abbildung 23 die hohe Pufferkapazität des Systems. Erst bei Argininphosphatgehalten unter 5 umol/g FG sinkt der ATP-Gehalt drastisch und der ADP- und der AMP-Gehalt steigen entsprechend stark an. Dieser Wert entspricht dem Schwellenwert des Phosphagengehaltes, der im Introvertretraktor auch in vivo nicht unterschritten wird. Möglicherweise entspricht das resultierende Phosphorylierungspotential dem Wert, unterhalb dessen die freie Energie der Hydrolyse des ATP nicht mehr ausreicht, die energieverbrauchenden Prozesse zu treiben (vgl. Kammermeyer et al., 1982). Auch eine Begrenzung durch die kinetischen Eigenschaften der Argininkinase wäre denkbar.

Nimmt man an, daß ein ATP/ADP-Verhältnis von 6 die kritische Grenze ist unterhalb derer der Phosphagenabbau stagniert, so können Muskeln, die 4 umol/g FG Octopin akkumulieren etwa 1 umol/g FG mehr abbauen als Muskeln, die unter sonst gleichen Bedingungen kein Octopin akkumulieren. Angesichts eines Gesamt-Phosphagenabbaus von 15 umol/g FG erscheint dieser Wert relativ gering. Der oft zitierte "Vorteil" der Octopinbildung gegenüber der Laktatbildung, der darin besteht, daß eine Kondensation von Arginin mit Pyruvat die Phosphagenkinasereaktion begünstigt (Hochachka, 1980) ist damit wahrscheinlich nicht so bedeutend wie oft angenommen wird.

Bei Argininphosphatgehalten unter 8 umol/g FG ist auch ein starker Anstieg des AMP-Gehaltes zu beobachten. Bis zu diesem Punkt ist die Myokinasereaktion für die ATP-Bereitstellung unbedeutend. Der AMP-Gehalt verändert sich zwar auch oberhalb dieses Wertes, der Absolutgehalt bleibt jedoch unter 30 nmol/g FG. Möglicherweise setzt mit dem Anstieg des AMP-Gehaltes eine Desaminierung des AMP ein, da der berech-

nete Gesamtadenylatgehalt der Versuchsmuskeln ($ATP_{gemessen}$ + $ADP_{berechnet}$ + $AMP_{berechnet}$; s. Abbildung 23) bei niedrigem Argininphosphatgehalt abnimmt. Eine Abnahme des gemessenen Gesamtgehaltes an Adenylaten um etwa 27 % läßt sich tatsächlich in Gewebeextrakten nachweisen (Kreutzer, 1982). Eine Desaminierung von AMP zu IMP könnte die Abweichung des gemessenen ATP-Gehalts der Muskeln von der für 5 umol/g FG Adenylate berechneten "Pufferkurve" (s. Abbildung 23) erklären.

In Tabelle 15 sind die anhand des Argininkinase und Myokinase-Gleichgewichts für einen intrazellulären pH von 7.35 errechneten ADP und AMP-Gehalte der Muskeln aufgeführt. Die geringfügigen Änderungen des intrazellulären pH (s. Tabelle 14, S. 82) wurden dabei nicht berücksichtigt, da eine Änderung des pH um 0.1 Einheiten die Werte nur um den Faktor 1.26 verändert. Den berechneten Werten sind jeweils die gemessenen ADP- und AMP-Gehalte aus einer früheren, vergleichbaren Versuchsreihe (Kreutzer, 1982) gegenübergestellt (s. auch ADP und AMP-Gehalte in Tabelle 5, S. 56). Die Differenz zwischen gemessenen und berechneten Werten repräsentiert den gebundenen Anteil des ADP und AMP, der in Kontrollmuskeln 94 bzw. 99.8 % beträgt. Ein großer Teil des ADP ist wahrscheinlich an das Aktin des Muskels gebunden (Perry, 1952), wird jedoch bei der Perchlorsäurebehandlung extrahiert.

Tabelle 15: Anhand des Argininkinase- und des Myokinaseequilibriums berechnete ADP- und AMP-Gehalte (nmol/g FG) des Introvertretakors von S.nudus nach verschiedenen Zeiten isometrischer Kontraktion mit einer Frequenz von 0.1 Hz. (K'_{eq} Argininkinase = 30.23 (pH 7.35), Graham et al., 1986; K'_{eq} Myokinase = 1.12 (1 mM Mg^{++}), Veech, 1978) sowie in Gewebeextrakten gemessene Werte (*) (Kreutzer, 1982).

	NORMOXIE				HYPOXIE	
min	ADP	ADP*	AMP	AMP*	ADP	AMP
0	34	560	0.2	90	32	0.2
10	151	690	5.0	200	201	9.0
20	265	830	17.9	260	377	38.8
40	340	1220	36.0	510	365	38.3
60	324	970	37.9	350	397	49.0

Ein Anstieg des ADP und AMP-Gehaltes läßt sich sowohl an den gemessenen als auch an den berechneten Werten ablesen. Der relative Anstieg ist jedoch für die berechneten (freien) Gehalte größer. Das gemessene ADP steigt etwa auf das Doppelte, während der berechnete Gehalt etwa das Zehnfache des Ruhewertes beträgt. Ähnliches gilt für den AMP-Gehalt. Chih & Ellington (1986) berechneten einen ähnlichen Anstieg des freien ADP und AMP für den kontrahierenden Adduktor der Kammuschel. Auch in diesem Muskel beträgt der gebundene Anteil des ADP und AMP etwa 90 %.

Der stärkste relative Anstieg des ADP- und AMP-Gehaltes findet in den ersten 10 min der Aktivität statt. Dies könnte ein Signal für die etwa 20fache Steigerung des Glykolyseflusses (s. nächster Abschnitt, 4.2.1) und die Steigerung der Atmung (s. 4.1.1) sein. Meinardus-Hager (1986) untersuchte die Regulation der Glykolyse in der Herzmuschel Cardium tuberculatum und identifizierte die Phosphorylase, die Phosphofructokinase und die Pyruvatkinase als Regulationspunkte. Als Regulationsmechanismen bei starker Muskelaktivität diskutiert er anhand der kinetischen Daten der Enzyme eine Aktivierung der Phosphorylase durch kovalente Modifikation (Umwandlung von der b- in die a-Form), und vor allem die Aktivierung der Phosphofructokinase durch den sinkenden Energy Charge.

Da der ADP und AMP-Gehalt mit zunehmender Versuchszeit noch weiter ansteigt, sollte man auch eine Zunahme der Glykolyserate erwarten. Der Glykolysefluß bleibt jedoch, gemessen an der Octopinbildung, weitgehend konstant (s. Abbildung 11, S.49) Möglicherweise wird eine zunehmende Aktivierung der Phosphofructokinase durch den Anstieg des NADH/NAD-Verhältnisses (s. Tabelle 12, S. 77 sowie 4.2.3.), der sich auf die Reaktion der Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase hemmend auswirkt, kompensiert.

Die Rolle des Phosphagensystems beschränkt sich also nicht nur darauf, bei plötzlicher Steigerung des Energiebedarfs eine Abname des ATP-Gehalts wirksam abzupuffern. Über dieses

System kann gleichzeitig jede Änderung des Energiebedarfs über einen Anstieg des ADP- und AMP-Gehaltes auch anderen energieliefernden Stoffwechselwegen proportional "mitgeteilt" werden. Diese integrierende Funktion des Phosphagens macht auch den Befund verständlich, daß für den Introvertretraktor eine enge Beziehung zwischen der Kontraktionsfrequenz, dem Phosphagenabbau und der Glykolyserate besteht (Kreutzer, 1982). Auch der in vivo Versuch (s. Tabelle 5 S. 56) paßt in dieses Bild: Einem geringeren Phosphagenabbau in diesem Experiment entspricht auch eine geringere Glykolyserate (1.07 umol/g FG·h gegenüber 2.04 umol/g FG·h in vitro). Interessant wäre die Frage, ob auch die Atmung eine solche Graduierung zeigt, oder ob der Sauerstoffverbrauch bei einsetzender Aktivität jeweils maximal stimuliert ist. Nach Chance et al. (1986) ist die Empfindlichkeit der Atmungskette für ADP etwa 10fach höher, als die der Glykolyse, was jeweils eine maximale Stimulation der Atmung bewirken müßte.

Die Transportfunktion des Argininphosphat/Agininkinasesystems für energiereiches Phosphat von den Mitochondrien zu den kontraktilen Elementen (Bessman & Geiger, 1981; Meyer et al. 1984) ist in diesem Muskel wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung, da das Phosphagen selbst den Hauptanteil der Energie bei hohem ATP-Umsatz liefert, und der mitochondriale Beitrag zur ATP-Produktion relativ gering ist.

4.1.3 Anaerobe Glykolyse und Succinatgärung

Abbildung 22 (S. 88) zeigt, daß die anaerobe Glykolyse, die bei isometrischer Kontraktion zum Endprodukt Octopin führt, konstant 5.76 bzw. 6.12 umol ATP/g FG·h produziert. Der prozentuale Anteil an der anaeroben Energiebereitstellung ist bei hoher Kraftentwicklung gering (10 bzw. 12 %), steigt aber mit Erschöpfung des Phosphagengehaltes und zunehmender Ermüdung des Muskels. Allerdings ist dann auch der Gesamt-ATP-Umsatz niedriger. Geht man von einem etwa dreifach erhöhten Sauerstoffverbrauch aus, so produziert in normoxen Muskeln die anaerobe Glykolyse weniger ATP als die oxidative

Phosphorylierung. Bei Aktivität unter hypoxen Bedingungen stellt sie nach Erschöpfung des Phosphagenvorrates jedoch 78 % des ATP-Umsatzes. Der Succinatweg wird in hypoxen Muskeln zwar aktiviert, liefert aber mit 0.47 umol ATP/g FG·h nur 6 % des Gesamt-Umsatzes.

Die Bedeutung der anaeroben Glykolyse liegt also sicher stärker in der Kontinuität der ATP-Produktion, als in einer hohen ATP-Bildungsrate. Arbeitet der Muskel unter normoxen Bedingungen, so ergänzt sie die ATP-Produktion aus der Atmung. Bei Aktivität unter hypoxen Bedingungen stellt sie nach Abbau des Phosphagens die einzige Energiequelle dar, da die ATP-Bildung durch die Succinatgärung quantitativ unbedeutend ist. In vivo ist Aktivität unter stark hypoxen Bedingungen für den Introvertretraktor möglicherweise eine nicht seltene Situation, da bei starker Grabaktivität der O_2-Partialdruck im Coelom auf sehr niedrige Werte sinken kann (Pörtner, 1982).

4.1.4 Funktionsbedingte "Hypoxie"?

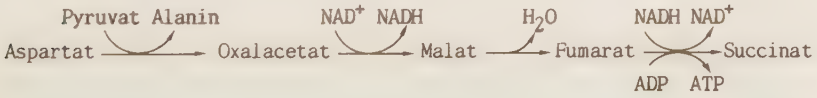
Angesichts der großen Bedeutung des anaeroben Stoffwechsels bei hohem ATP-Umsatz des Muskels stellt sich die Frage, ob die überwiegende Anzahl der Muskelfasern überhaupt zwischen Normoxie und Hypoxie in der Umgebung des Muskels unterscheiden kann, und ob nicht auch der normoxe Muskel zumindest partiell unter hypoxen Bedingungen arbeitet und in den vom Sauerstoffmangel betroffenen Fasern auf eine anaerobe Energiegewinnung ausweichen muß. Der Unterschied in der anaeroben Energieproduktion zwischen normoxen und hypoxen Muskeln käme dann dadurch zustande, daß in den normoxen Muskeln einige wenige (äußere) oxygenierte Muskelzellen nicht an der anaeroben Energieproduktion beteiligt sind.

So wird in den meisten Lehrbüchern das Einsetzen einer Laktatproduktion im Vertebratenmuskel mit einer ungenügenden Sauerstoffzufuhr erklärt: "Wenn ein tierisches Gewebe, wie z.B. ein aktiver Muskel, weniger Sauerstoff erhält, als es

für die Erzeugung einer ausreichenden Menge von ATP durch die Atmungskettenphosphorylierung benötigt, wird ein Teil der Brenztraubensäure ..... zu Milchsäure reduziert" (Eckert & Randall, 1986). Diese Erklärung beruht auf dem experimentellen Befund, daß viele Muskeln bei Hypoxie oder Anoxie Energie aus der anaeroben Glykolyse gewinnen. Der Umkehrschluß, daß eine Hypoxie der Mitochondrien die Voraussetzung für das Einsetzen eines anaeroben Stoffwechsel ist, wird meist impliziert, da man generell für das Einsetzen einer anaeroben Energiegewinnung folgende Kausalkette annimmt: Ein erhöhter ATP-Verbrauch führt über ein erniedrigtes cytoplasmatisches ATP/ADP·P_i-Verhältnis zu einer Stimulation der Atmung. Dadurch entsteht ein intrazellulärer Diffusionsgradient für O_2 (vgl. Jones, 1986) der die mitochondriale Atmung limitiert und über einen weiteren Anstieg des ADP- und AMP-Gehaltes zu einer Stimulation der Glykolyse führt.

Nicht in dieses Bild einer intrazellulären Hypoxie unter normoxen äußeren Bedingungen paßt der Befund, daß der kontrahierende Introvertretraktor unter Normoxie und Hypoxie zwar in gleichem Ausmaß Octopin akkmuliert, eine Succinatproduktion sich jedoch nur in hypoxen Muskeln nachweisen läßt. Die folgenden Überlegungen verdeutlichen dies:

Sipunculus nudus kann, wie viele andere Invertebraten (s. Einleitung) Succinat über die Reaktionssequenz:



bilden (Pörtner, 1982). Die Reaktion vom Fumarat zum Succinat bezieht die Atmungskette ein (Schroff & Schöttler, 1977) und läuft vermutlich nur ab, wenn die Elektronen nicht über Cytochrom b und c auf die Cytochromoxidase und damit auf den Sauerstoff fließen können.

Introvertretraktoren, die unter Normoxie kontrahierten, wiesen nach 40 bzw. 60 min einen Succinatgehalt auf, der

gegenüber dem Kontrollwert nur um 0.02 umol/g FG erhöht war, während unter Hypoxie kontrahierende Muskeln innerhalb von 1 h 0.19 umol/g FG linear akkumulierten. Diese 10fach höhere Succinatbildung der hypoxen Muskeln bei einer Erhöhung der anaeroben Energieproduktion um nur 15 %, ist ein starkes Indiz dafür, daß der Grad der Hypoxie der einzelnen Fasern unter Normoxie und Hypoxie sehr viel unterschiedlicher ist, als das Ausmaß der anaeroben Energiegewinnung. Geht man davon aus, daß ein anaerober Stoffwechsel erst dann einsetzt, wenn den Mitochondrien kein Sauerstoff mehr zur Verfügung steht, so sollte der Unterschied in der Succinatakkumulation dem Unterschied in der anaeroben Energieproduktion zumindest annähernd entsprechen. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß die anaerobe Glykolyse in diesem Muskel auch bei ausreichender Sauerstoffversorgung abläuft.

Die geringe Succinatmenge, die in normoxen Fasern akkumuliert, könnte auf einen geringen Anteil hypoxer Fasern im Inneren des Muskels zurückzuführen sein, die bei gesteigerter Atmung nicht mehr ausreichend versorgt werden. Es ist aber sehr unwahrscheinlich, daß diese Fasern für die gesamte anaerobe Energieproduktion verantwortlich sind. Der von vielen Autoren benutzte Audruck funktionsbedingte "Hypoxie" wäre damit für diesen Muskel nur bedingt anwendbar.

Vergleichbar sind Befunde an Vertebratenmuskeln; so wiesen Connett et al. (1984) im isolierten Gracilis-Muskel des Hundes bei steigenden Reizfrequenzen eine steigende Laktatakkumulation nach und belegten, daß das Myoglobin des Muskels unter diesen Bedingungen mit O_2 gesättigt war. Jöbsis (1963) wies im Sartorius Muskel von Amphibien eine Laktatakkumulation bei voller Oxygenierung des Cytochrom aa_3 nach.

Diese und andere Befunde führten zu einer vehementen Diskussion um die Regulation und Funktion der "aeroben" anaeroben Glykolyse (s. Wasserman, 1986), und waren ein Anstoß, zu prüfen, ob sich die Theorien zur aeroben Laktatbildung im Vertebratenmuskel auch auf einen Invertebratenmuskel wie den

Introvertretraktor anwenden lassen.

So diskutiert Brooks (1986) die aerobe Laktatproduktion als ein unvermeidliches Nebenprodukt des gesteigerten aeroben Energieumsatzes bei Aktivität. Die aerobe Laktatproduktion dient seiner Ansicht nach nicht primär der Steigerung der Energieproduktion, sondern kommt zwangsläufig dadurch zustande, daß der cytoplasmatische NADH-Spiegel in Folge des gesteigerten aeroben ATP-Umsatzes erhöht ist. Ein Regulationsmodell für den Zusammenhang zwischen Laktatgehalt und aerober Funktion der Mitochondrien stellen Chance et al. (1986) vor. Zwar erklärt das Modell, wie es auch unter aeroben Bedingungen zu einer Laktatbildung kommen kann, eine hohe Netto-Laktatproduktion wird jedoch nur erreicht, wenn den Mitochondrien nicht mehr genügend Sauerstoff zur Verfügung steht. Connett et al. (1984) vermuten, daß die aerobe Laktatbildung durch eine Erhöhung des cytosolischen Redoxpotentials ($NADH/NAD^+$) den Malat-Aspartat-Shuttle stimuliert und damit die mitochondriale ATP-Produktion begünstigt. Der ursächliche Zusammenhang wäre also in diesem System genau umgekehrt, wie der von Brooks (1986) postulierte.

Ein Vergleich dieser Hypothesen mit den Verhältnissen im Introvertretraktor ist problematisch, da sie sich vorwiegend auf Muskeln beziehen, die als oxidative (rote) Muskeln einzuordnen sind, und in denen die glykolytische ATP-Bildung nur einen Bruchteil der mitochondrialen ausmacht.

Für den Introvertretraktor, der auch bei Berücksichtigung des aeroben Stoffwechsels eher einem glykolytischen (weißen) Muskel gleicht, und in dem die Funktion der anaeroben Glykolyse per se nicht in Frage gestellt werden muß, erscheint folgende einfache Erklärung plausibel: Da das Gewebe nur wenige Mitochondrien enthält, reicht bei hohem ATP-Umsatz deren Gesamt-Kapazität auch bei starker Stimulation der Atmung und ausreichender Sauerstoffversorgung nicht aus, den ATP-Bedarf zu decken. Die mitochondriale ATP-Produktion wird demnach in diesem Muskel nicht durch die Mechanismen des Sauerstofftransports, sondern durch die Kapazität der Mito-

chondrien selbst bestimmt, die nur einen Bruchteil des glykolytisch gebildeten Pyruvat und NADH zur ATP-Produktion nutzen können.

Eine Anoxie der Mitochondrien tritt möglicherweise deshalb nicht ein, da der Retraktor nur wenige Mitochondrien enthält und diese ausreichend versorgt werden können. Jones (1986) sieht vor allem in einer dichten Zusammenlagerung von Mitochondrien die Ursache für intrazelluläre Diffusionsgradienten. Auch ein Myohaemerythrin, analog dem Myoglobin der Vertebraten, wurde für einige Sipunculiden beschrieben (Klippenstein, 1980). Die helle , weißliche Färbung des Introvertretraktors macht das Vorkommen dieses rot gefärbten Proteins in diesem Muskel allerdings nicht sehr wahrscheinlich.

Jöbsis & Stainsby (1968) sehen in der Kapazität des Citratzyklus den limitierenden Faktor der mitochondrialen ATP-Produktion im Gracilis- und im Gastrocnemius-Muskel des Hundes. Sie finden bei kontraktiler Aktivität des Muskels eine Abnahme des intramitochondrialen NADH-Gehalts und werten dies als Hinweis, daß nicht die Kapazität der oxidativen Phosphorylierung selbst, sondern die Kapazität der NADH-liefernden Mechanismen die intramitochondriale ATP-Produktion begrenzt.

Eine funktionelle und räumliche Kompartimentierung von glykolytischem ATP für den Ionentransport und durch die Atmung produziertem ATP für die Muskelkontraktion, wie sie von Paul (1983) postuliert wird, läßt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht ausschließen, es bestehen jedoch auch keine Anhaltspunkte, daß eine solche Kompartimentierung existiert. Vor allem müßte ein solcher Mechanismus in diesem Muskel auch das Phosphagen als Hauptenergielieferanten für die Muskelkontraktion einbeziehen.

Auch die "aerobe" anaerobe Glykolyse des Introvertretraktors bleibt damit ein Mechanismus, der in erster Linie dazu dient, bei gesteigertem Energiebedarf die ATP-Produktion zu

ergänzen. Jedoch sollte der Befund, daß Atmung und anaerobe Glykolyse gleichzeitig in derselben Zelle ablaufen können, Anlaß dazu sein, in zukünftigen Untersuchungen auch möglichen Wechselwirkungen zwischen anaerober Glykolyse und aerober Atmung Beachtung zu schenken, z.B. der Frage ob Muskelaktivität tatsächlich immer mit einer maximalen Stimulation der Atmung verbunden ist, oder ob möglicherweise doch eine regulatorische Beziehung zwischen Glykolyserate und Atmungsaktivität besteht.

4.2 Der Dualismus der anaeroben Endproduktbildung

Die unter 4.1 diskutierten Experimente zur funktionsbedingten Anaerobiose des Introvertretraktors zeigten, daß die anaerobe Energiegewinnung durch die Substratkettenphosphorylierungen der Glykolyse immer zu Octopin als glykolytischem Endprodukt führt. Diese Octopinbildung ist qualitativ, und mit geringen Einschränkungen auch quantitativ unabhängig davon, ob der Muskel unter normoxen oder unter hypoxen Bedingungen kontrahiert. (s. 3.1.1, S. 46). Bei langfristiger Hypoxie wird dagegen vorwiegend Strombin als glykolytisches Endprodukt gebildet (s. 3.1.4, S. 57).

Wurde auch eingangs Octopin als das typische Endprodukt der anaeroben Glykolyse bei Aktivität und Strombin als das typische Endprodukt bei Hypoxie bezeichnet, so scheint es doch unter Einbeziehung dieser Ergebnisse angebrachter, Octopin zwar als das typische Endprodukt bei Aktivität, Strombin jedoch als das typische Endprodukt der anaeroben Glykolyse des Muskels in Ruhe zu bezeichnen.

Der Schlüssel zu den physiologischen Ursachen eines solchen Dualismus der anaeroben Glykolyse ist also nicht primär in der Verfügbarkeit von Sauerstoff, sondern möglicherweise im Aktivitätszustand des Muskels zu suchen. Ein direkter Zusammenhang zwischen Energiebedarf und Octopinbildung ist allerdings kaum vorstellbar, da die ATP-Ausbeute der anaero-

ben Glykolyse per se unabhängig von der Art des gebildeten Endprodukts ist.

4.2.1 Muskelaktivität und langfristige Hypoxie

Nachdem die Situation der funktionsbedingten Anaerobiose unter 4.1 ausführlich behandelt wurde, soll auch die Situation der langfristigen oder "biotopbedingten" Hypoxie zunächst kurz charakterisiert werden.

Wie bei kurzfristiger, starker Muskelaktivität wird auch bei langfristiger Hypoxie des ruhenden Muskels das Phosphagen als Energiequelle genutzt. Der Abbau von L-Argininphosphat stellt in den ersten 2.5 h der Hypoxie etwa 80 % der ATP-Produktion. Zwar ist ein Anstieg der glykolytischen Endprodukte Octopin (um 0.2 umol/g FG) und Strombin (um 0.1 umol/G FG) sowie des Succinats (um 0.2 umol/g FG) nachweisbar Tabelle 6, S. 58), die anaerobe Glykolyse und Succinatgärung tragen jedoch nur in geringem Umfang zur Energiegewinnung bei. Die Bildung von Acetat und Propionat wurde nicht untersucht, sie dürfte jedoch in den ersten 2.5 h für die Gesamt-Energieproduktion unbedeutend sein (vgl. Pörtner, 1982).

Die Gesamt-Energieproduktion ist schon in den ersten 2.5 Stunden der Hypoxie um 37 % geringer als unter aeroben Ruhebedingungen. An anderen fakultativ anaeroben Invertebraten konnte im Verlaufe sehr langer Phasen der Hypoxie eine Stoffwechselreduktion bis zu 90 % nachgewiesen werden (Shick et al., 1983).

Die Succinatbildung erfolgt während des untersuchten Zeitraums von insgesamt 7.5 h wahrscheinlich aus dem Aspartat (Schöttler et al., 1984; Pörtner, 1982), dessen Gehalt korrespondierend abnimmt. Signal für das Einsetzen der Succinatbildung dürfte ein Anstieg des mitochondrialen Redoxpotentials als Folge der Hypoxie sein. Interessanterweise betragt die Geschwindigkeit der Succinatbildung (64 nmol/g

FG·h) etwa ein Drittel der Geschwindigkeit, die für hypox kontrahierende Muskeln berechnet werden kann (188 nmol/g FG·h). Dieser Unterschied ist, verglichen mit der Glykolyserate und dem Energieumsatz (s.u.), relativ gering. Dies würde für die Hypothese sprechen (De Zwaan & Putzer, 1985), daß der Beitrag der Succinatgärung zur anaeroben Energiegewinnung bei biotopbedingter und funktionsbedingter Anaerobiose in erster Linie von der (Maximal-)Kapazität dieses Stoffwechselweges abhängt. Diese Hypothese müßte allerdings dahingehend modifiziert werden, daß dies nur gilt, wenn durch die starke Muskelaktivität tatsächlich hypoxe Zustände im Inneren der Zellen entstehen. Die Rate der Succinatbildung wird offensichtlich unmittelbarer durch das Sauerstoffangebot beeinflußt als die anderen anaeroben Stoffwechselwege und läßt sich nur in sehr viel engeren Grenzen modulieren als z.B. die Glykolyserate. Als modulierender Faktor unter experimentellen Bedingungen wirkt z.B. Malat im Inkubationsmedium (Wiesner, 1986; eigene vorläufige Ergebnisse), das die Succinatproduktion steigert. Möglicherweise ist auch der Unterschied in den Succinatbildungsraten bei Aktivität und Hypoxie im höheren Malatgehalt der kontrahierenden Muskeln begründet. Physiologisch erscheint eine maximale Ausnutzung des Succinatweges in beiden Situationen sinnvoll, da er von allen anaeroben Stoffwechselwegen die höchste ATP-Ausbeute hat, und da eine Anhäufung der Endprodukte durch Ausscheidung in das Medium verhindert werden kann (vgl. De Zwaan & Putzer, 1985).

Die anaerobe Glykolyse leistet, ähnlich wie die Succinatgärung in den ersten 2.5 h der Hypoxie einen Beitrag von nur etwa 10 % zur Gesamt-Energieproduktion. Als Endprodukte werden sowohl Octopin als auch Strombin gebildet. Nach 7.5 h überwiegt jedoch die Strombinproduktion (1.02 umol/g FG in 7.5 h) deutlich gegenüber der Octopinproduktion (0.23 umol/g FG). Die mittlere Glykolyserate beträgt (0.08 umol/g FG·h) und liegt damit im Bereich des normoxen Ruhewertes (0.09 umol/g FG·h).

Die für die funktionsbedingte Anaerobiose postulierte Integration von Phosphagenabbau und Glykolyserate über den Gehalt der Adenylate folgt unter Hypoxie offensichtlich anderen Gesetzmäßigkeiten als unter Normoxie. So sind z.B die Phosphagenwerte der ruhend inkubierten Muskeln nach 7.5 Stunden Hypoxie etwa mit denen des Experimentes zur funktionsbedingten Anaerobiose in vivo (3.1.3) zu vergleichen. Die Glykolyserate der letzteren Muskeln ist jedoch um den Faktor 13 höher als die der ruhend unter Hypoxie inkubierten Muskeln. Bei gleichem Phosphagengehalt wäre auch der gleiche ADP- und AMP-Gehalt und damit auch eine ähnliche Stimulation der Glykolyse zu erwarten. Zudem akkumulieren die "arbeitenden" Muskeln Octopin und nicht Strombin als Endprodukt der anaeroben Glykolyse.

Das Fehlen einer Stimulation der Glykolyserate auch bei Absinken des Phosphagengehaltes ist ein Charakteristikum der biotopbedingten Anaerobiose (De Zwaan & Wijsman, 1976). In einigen Fällen beobachtet man sogar eine Reduktion der Glykolyserate (Meinardus-Hager, 1986). Als Regulationsmechanismen werden die fehlende Stimulation der Phosphorylase, eine Hemmung der Pyruvatkinase durch Alanin, das beim Aspartatabbau entsteht (De Zwaan, 1977), eine kovalente Modifikation der Pyruvatkinase (Holwerda et al., 1983) sowie eine Konzentrationsabnahme des Aktivators der Phosphofruktokinase, Fructose-2,6-Bisphosphat (Storey, 1985) diskutiert.

In Tabelle 16 sind die Glykolyseraten und der Energieverbrauch bei funktionsbedingter und biotopbedingter Anaerobiose sowie die aeroben Ruhewerte des Muskels aufgeführt. Diese Gegenüberstellung macht den grundsätzlichen Unterschied zwischen biotopbedingter und funktionsbedingter Anaerobiose noch einmal deutlich: Der Energieumsatz bei Aktivität ist gegenüber dem Ruhewert stark gesteigert, während der Energieverbrauch bei biotopbedingter Hypoxie um etwa ein Drittel sinkt. Der Wert von 25 umol/g FG·h für die kontrahierenden Muskeln stellt zudem nur den Mittelwert über den Zeitraum von 1 h dar. In den ersten 5 min kann der Energieverbrauch über 100 umol/g FG·h betragen (Kreutzer, 1982). Die Glykoly-

serate bleibt in ruhenden Muskeln unter Hypoxie etwa auf dem Niveau des normoxen Ruhewertes, bei Aktivität ist dagegen eine 23fache Steigerung des Glykolyseflusses zu verzeichnen.

Tabelle 16: ATP-Umsatz und Glykolyserate des Introvertretraktors unter Normoxie, sowie bei biotopbedingter (Ruhe, Hypoxie) und funktiosbedingter Anaerobiose (isometrische Kontraktion, Hypoxie). Die Werte wurden aus dem O_2-Verbrauch, sowie den Phospho-L-Arginin-, ATP-, Octopin-, Strombin-und Succinatgehalten der Experimente 3.1.1, 3.1.2 und 3.1.4 berechnet.

	ATP-Umsatz (umol/g FG·h)	Glykolyserate (umol/g FG·h)
Ruhe Normoxie	3.3	0.09
0 - 7.5 h Ruhe Hypoxie	1.4	0.08
1 h Aktivität Hypoxie	25.0	2.04

Der Unterschied zwischen der funktionsbedingten und der, hier untersuchten, Frühphase der biotopbedingten Anaerobiose (vgl. Schöttler et al., 1984) liegt also nicht in erster Linie darin, daß die potentiellen Mechanismen der anaeroben Energiegewinnung in unterschiedlichem Ausmaß genutzt werden. Er besteht vielmehr in einem drastischen Unterschied im Energieumsatz, der mit einem ebenso großen Unterschied in der Glykolyserate verbunden ist. Mit Blick auf die Regulation der glykolytischen Endproduktbildung ließe sich dieser Unterschied auch folgendermaßen formulieren: Die glykolytischen Endprodukte müssen bei funktionsbedingter Anaerobiose sehr viel schneller gebildet werden als bei biotopbedingter Anaerobiose.

4.2.2 Die Opindehydrogenasen

Wie Tabelle 7 (S.61) zeigt, besitzt der Retraktor drei Pyruvatreduktaseaktivitäten, Octopin-, Alanopin- und Strombindehydrogenase. Während Octopin und Strombin auch unter physiologischen Bedingungen als Endprodukte der anaeroben

Glykolyse gebildet werden, ließ sich Alanopin im Retraktor nur in Spuren nachweisen. Zu einer geringfügigen Akkumulation von 0.2 umol/g FG kommt es nur nach mehr als 12 stündiger Anaerobiose im Hautmuskelschlauch der Tiere (Pörtner et al., 1984a). Dieser Befund ist um so erstaunlicher, als die Alanopindehydrogenaseaktivität in Rohextrakten der Muskelgewebe über der Strombindehydrogenaseaktivität liegt.

Wie Abbildung 16 (S. 67) zeigt, besitzt Sipunculus nudus mindestens zwei verschiedene Proteine, die in unterschiedlichem Ausmaß mit den drei Aminosäuren Glycin, L-Alanin und L-Arginin reagieren. Der Befund, daß Alanopin- und Strombindehydrogenase in demselben Protein lokalisiert sind, stimmt mit den Ergebnisen an anderen marinen Invertebraten überein. Die K_m-Werte dieser Alanopin/Strombindehydrogenasen für die Aminosäuren liegen meist über 10, mM während die K_m-Werte der Octopindehydrogenasen unter diesem Wert bleiben (s. Gäde & Grieshaber, 1986).

In Tabelle 17 sind die K_m-Werte des Enzyms aus Sipunculus nudus den physiologischen Konzentrationen (Gewebegehalt/Zellwasserfraktion) der Substrate gegenübergestellt. Die K_m-Werte der ODH für die Octopindehydrogenasereaktion stimmen gut mit den Werten überein, die von Haas et al. (1973) für die Octopindehydrogenase aus S. nudus publiziert wurden.

Tabelle 17: Apparente K_m-Werte der Octopin- und der Strombindehydrogenase von S. nudus (Daten aus Tabelle 10 und 11), sowie physiologische Konzentrationen der Substrate im Retraktormuskel (gemessener Substratgehalt (umol/g FG)/0.575 (ml/g FG) s. 3.3.2). * uM

Substrat	ODH Km(mM)	StrDH Km(mM)	phys. Konz. (mM)
Glycin	660	58	410
L-Alanin	492	105	8 - 10
L-Arginin	2.7	2.7	4.3 - 36
Pyruvat	1.2	1.2	0.08 - 0.37
NADH*	32	19	2.4 - 6.6
Octopin	0.6	0.6	0.1 - 7.1
Alanopin	/	2.3	/
Strombin	/	12.8	0.9 - 3.1
NAD^+	0.046	0.12	0.1

Die Daten deuten darauf hin, daß Octopin- und Strombinbildung *in vivo* von verschiedenen Enzymen katalysiert werden, obwohl beide Dehydrogenasen mit allen drei Aminosäuren reagieren: Die ODH hat eine wesentlich höhere Affinität für Arginin als für die beiden anderen Aminosäuren. Die K_m-Werte für Alanin und Glycin liegen oberhalb des physiologischen Bereichs. Zudem ist der Umsatz dieser Aminosäuren in Abwesenheit von Imidazol stark gehemmt (s. 3.2.3 c). Die Rückreaktion mit Strombin ließ sich nicht, die mit Alanopin nur in geringem Umfang nachweisen. Dieses Enzym katalysiert also bevorzugt die reduktive Kondensation von Pyruvat und Arginin, und es ist anzunehmen, daß dieses Enzym *in vivo* ausschließlich für die Octopinbildung verantwortlich ist.

Das unter Vorwegnahme der Diskussion schon als Strombindehydrogenase bezeichnete Protein zeigt eine vergleichbare Affinität für Arginin, die Kapazität für die Octopinsynthese ist jedoch gering, und es bestehen Hinweise, daß zumindest ein Teil der Octopindehydrogenaseaktivität durch eine Verunreinigung mit ODH-Protein verursacht ist. Die apparenten K_m-Werte, sowie die spezifischen Aktivitäten der Reaktionen mit Alanin und Glycin liegen für beide Aminosäuren in der gleichen Größenordnung. Ein Vergleich mit den physiologischen Alanin und Glycinkonzentrationen (s. Tabelle 17) zeigt jedoch, daß selbst der maximale Alaningehalt noch um den Faktor 10 unter dem K_m-Wert des Enzyms liegt, während Glycin im Überschuß vorhanden ist (7fache K_m). Diese Relation könnte zwar den Befund erklären, daß bei biotopbedingter Anaerobiose Strombin und nicht Alanopin ein Endprodukt der anaeroben Glykolyse ist. Er löst allerdings nicht das Problem, daß gemessen an der Relation der Maximalaktivitäten der Enzyme im Gewebeextrakt, (229 U/g FG ODH gegenüber 12.9 U/g FG StrDH), auch in dieser Situation die Octopinbildung gegenüber der Strombinbildung bevorzugt sein müßte.

Der hohe K_m-Wert der Strombindehydrogenase für die Rückreaktion mit Strombin könnte dafür verantwortlich sein, daß in Erholungsexperimenten nach biotopbedingter Anaerobiose nur ein äußerst langsamer Abbau des Strombins erfolgt (Pörtner

et al., 1986b).

Für eine Regulation des Dualismus der anaeroben Endproduktbildung über die Substrataffinitäten der Enzyme kamen theoretisch folgende Mechanismen in Betracht:

1. ODH und StrDH könnten durch unterschiedliche Arginin- und Glycinkonzentrationen bei biotopbedingter und funktionsbedingter Anaerobiose in unterschiedlichem Ausmaß aktiviert werden.

Da sich jedoch die hohen Glycingehalte der Muskeln kaum verändern, und ein Anstieg des Argininggehaltes sowohl bei funktionsbedingter als auch bei biotopbedingter Anaerobiose auftritt, erscheint ein solcher Mechanismus unwahrscheinlich. Selbst bei niedrigen Pyruvatkonzentrationen liegt der K_m-Wert für Arginin (8.9 mM bei 0.25 mM Pyruvat) unter der physiologischen Konzentration des Arginins bei biotopbedingter Anaerobiose (22 mM nach 5 h Hypoxie).

2. Die Enzyme könnten durch einen Anstieg der Pyruvat- und der NADH-Konzentration in unterschiedlichem Ausmaß aktiviert werden.

Die K_m-Werte für ODH und StrDH liegen jedoch beide in der gleichen Größenordnung und zudem weit über den physiologischen Konzentrationen im ruhenden Muskel. Ein Anstieg der physiologischen NADH- und Pyruvatkonzentration würde immer beide Enzyme aktivieren. Zwar könnte diese Aktivierung bei physiologischen Konzentrationen aller Reaktionspartner für ODH und StrDH unterschiedlich ausfallen, eine befriedigende Erklärung für einen Dualismus der anaeroben Endproduktbildung bieten die Substrataffinitäten der Enzyme jedoch nicht.

Im Hinblick auf die Bildung unterschiedlicher Opine bei niedrigem (biotopbedingtem) und hohem (funktionsbedingtem) Glykolysefluß (s. 4.2.1), erscheint es wichtig, auch die Maximalaktivitäten der beiden Enzyme in die Diskussion einzubeziehen:

Die Relation von Octopindehydrogenase zu Strombindehydrogenase beträgt etwa 20 : 1. Bei der biotopbedingten Anaerobiose bei einem Glykolysefluß von 0.08 umol/g FG·h wird vorwiegend Strombin, bei der funktionsbedingten Anaerobiose, bei einem Glykolysefluß von 2.04 umol/g FG·h wird vorwiegend Octopin als glykolytisches Endprodukt gebildet. Eine Korrelation zwischen der höchsten Enzymaktivität und dem bei Muskelaktivität vorwiegend gebildeten Endprodukt, läßt sich an anderen marinen Invertebraten bestätigen. Tabelle 18 zeigt für einige marine Invertebraten eine Zusammenstellung der Opindehydrogenaseaktivitäten und der glykolytischen Endprodukte bei funktionsbedingter Anaerobiose. Die Korrelation zwischen hoher Enzymaktivität und hoher Akkumulation des korrespondierenden Opins läßt vermuten, daß die Aktivität der anderen Opindehydrogenasen in den kurzen Zeiträumen der biotopbedingten Anaerobiose nicht ausreicht, die Bildung der entsprechenden Endprodukte zu katalysieren (s. auch Meinardus-Hager, 1986; Siegmund, 1986).

Tabelle 18: Pyruvatreduktaseaktivität in U/g FG (obere Zeile) und Opinproduktion (Δ Kontrolle - Aktivität) in umol/gFG (untere Zeile) verschiedener mariner Invertebraten. Quellen: (1) Grieshaber, 1982; (2) Siegmund, 1986; (3) Grieshaber & Kreutzer, 1987; (4) Meinardus-Hager & Gäde, 1986b; (5) Gäde, pers. Mitteilung.

Spezies	StrDH Strombin	AloDH Alanopin	ODH Octopin	LDH Laktat	Quelle
Arenicola	4.0	45.0	-	0.2	(1)
marina	1.6	8.0	-	0.1	(2)
Solen	6.1	39.1	131.7	-	(3)
marginatus	0.8	0.3	4.1	-	(2)
Cardium	18.1	21.4	117.1	4.0	(4)
tuberculatum	-	-	2.3	-	(4)
Nassa	2.4	29.3	186.0	10.7	(5)
mutabilis	-	1.5	7.9	0.7	(2)

Im Introvertretraktor von Sipunculus nudus entspricht die Relation von ODH- und StrDH-Aktivität (1 : 20) etwa dem Verhältnis des Glykolyseflusses bei funktionsbedingter und biotopbedingter Anaerobiose (1 : 23) unter den gewählten Versuchsbedingungen. Absolut gesehen liegt jedoch die Strom-

bindehydrogenaseaktivität 12.9 U/g FG (oder 12.9 umol/g FG·min) noch etwa um den Faktor 200 über der Octopinbildungsrate, so daß das Postulat, sie sei nicht "schnell" genug für die funktionsbedingte Anaerobiose nicht ohne weitere Erklärung haltbar erscheint. Beachtet man aber, daß sowohl die NADH als auch die Pyruvatkonzentration im Gewebe unter den K_m-Werten beider Enzyme liegen, so sind unter physiologischen Bedingungen sehr viel niedrigere Werte zu erwarten.

Anhand der kinetischen Daten der Enzyme lassen sich die in Rohextrakten bestimmten Maximalaktivitäten auf Werte extrapolieren, die denen bei physiologischen Pyruvat- und Aminosäurekonzentrationen angenähert sind (Berechnung s. 2.10.15).

Bei einer Pyruvatkonzentration von 0.08 mM, die dem Ruhewert des Muskels entspricht und einer Argininkonzentration von 4 mM beträgt die Octopindehydrogenaseaktivität 5.9 U/g FG bzw. umol/g FG·min (15°C). Bei einer Glycinkonzentration von 200 mM (unter der physiologischen Konzentration, jedoch wie diese sättigend für das Enzym) beträgt die Strombindehydrogenaseaktivität 0.45 umol/g FG·min. Die Strombindehydrogenaseaktivität liegt damit immer noch über der Octopinbildungsrate von 0.067 umol/g FG·min. Wenn jedoch beide Enzymaktivitäten durch die physiologischen Gegebenheiten noch um den Faktor 20 gesenkt werden, liegt die Strombindehydrogenaseaktivität mit 0.023 umol/g·min bereits unter, die Octopindehydrogenaseaktivität (0.30 umol/g FG·min) jedoch immer noch weit über der Octopinbildungrate.

Es ist nicht ausgeschlossen, daß ein noch unbekannter Hemmfaktor die Strombindehydrogenaseaktivität auf einen Wert erniedrigt, der unter dem Wert des Glykolyseflusses bei funktionsbedingter Anaerobiose und über dem Wert des Glykolyseflusses bei biotopbedingter Anaerobiose liegt (denn unter diesen Bedingungen kann ja offensichtlich Strombin gebildet werden). Es bestehen jedoch Hinweise, daß die Konzentration des NADH noch sehr viel geringer ist als der in

Tabelle 17 (S. 108) angegebene Wert, der aus dem Gesamt-Gehalt berechnet wurde (s. 4.2.3); und auch letzterer Wert ist geringer als der apparente K_m-Wert des Enzyms. Eine Begrenzung durch die NADH-Konzentration ist daher wahrscheinlich.

Beide Enzyme werden allerdings durch steigende Pyruvatkonzentrationen (s. 3.3.1) aktiviert. Bei 0.4 mM Pyruvat (z.B. nach 1h Kontraktion s. Tabelle 17, S. 108 sowie Tabelle 12, S. 77) ergibt sich eine ODH-Aktivität von 39 und eine StrDH-Aktivität von 1.9 umol/g FG·min. Auch der hypothetische Faktor 20 würde die Strombindehydrogenseaktivität dann in einen Bereich bewegen der noch über dem Glykolysefluß liegt. Ein solcher Zusammenhang könnte aber z.B. den Befund erklären, daß im in vivo Experiment zur funktionsbedingten Anaerobiose (s. 3.1.3) gegen Ende der Versuchszeit ein zwar geringer aber doch deutlicher Anstieg des Strombingehaltes zu verzeichnen ist. Auch der Befund, daß Tiere, die nur kurze Zeit nach dem Sammeln für Grabexperimente bei 17°C eingesetzt wurden größere Mengen an Strombin akkumulierten (Pörtner et al. 1984a), ließe sich damit zumindest hypothetisch erkären: Möglicherweise hatten diese frisch gesammelten Tiere höhere Pyruvatgehalte oder höhere Enzymaktivitäten - auch die Temperatur könnte eine Rolle spielen -, so daß die Strombindehydrogenaseaktivität ausreichte der glykolytischen Pyruvatbildung zu folgen.

Die Abschätzung der physiologischen Enzymaktivitäten zeigt, daß bei starker Muskelaktivität eine Aktivierung der ODH durch die steigenden Arginin- und Pyruvatkonzentrationen erfolgt. Ob diese Aktivierung eine regulatorische Bedeutung hat, wie es von vielen Autoren vermutet wird (z.B. De Zwaan & Putzer, 1985; Chih & Ellington, 1986), ist allerdings fraglich, da auch der Kontrollwert der ODH-Aktivität schon weit über der Octopinbildungsrate bei Aktivität (Faktor 90) und entsprechend noch höher (Faktor 2000) über der Pyruvatbildungrate bei Hypoxie liegt. Zudem könnte die Aktivierung der ODH durch steigende Pyruvatkonzentrationen zumindest teilweise durch den gleichzeitigen Anstieg des Endprodukts

Octopin kompensiert werden, da die ODH-Reaktion einer starken Endprodukthemmung unterliegt. Der K_i-Wert vieler Octopindehydrogenasen liegt im physiologischen Bereich (s.Gäde & Grieshaber, 1986). Funktionell dient die Pyruvat-Aktivierung möglicherweise eher dazu, eine zunehmende Octopin-Inaktivierung des Enzyms zu verhindern.

Wollte man dennoch eine Regulation der Octopinbildung über eine Aktivierung der ODH bei funktionsbedingter Anaerobiose postulieren, so müßte man auch eine spezifische Aktivierung der Strombindehydrogenase bei biotopbedingter Anaerobiose postulieren. Ein spezifischer "Aktivator" der Strombindehydrogenase konnte allerdings noch in keinem Fall nachgewiesen werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die kinetischen Daten der Opindehydrogenasen keine funktionelle Erklärung dafür bieten, daß zwei verschiedene Endprodukte bei biotopbedingter und funktionsbedingter Anaerobiose akkumulieren. Die geringen Aktivitäten der Strombin- und Alanopindehydrogenase unter physiologischen Bedingungen machen lediglich die Tatsache verständlich, daß der Retraktor in den kurzen Zeiträumen der funktionsbedingten Anaerobiose nur in geringem Umfang Strombin bildet, und daß sich Alanopin in beiden physiologischen Situationen nur in Spuren nachweisen läßt. Die Octopindehydrogenase sollte dagegen in jedem Fall ausreichende katalytische Aktivitäten erreichen, und dennoch wird bei biotopbedingter Anaerobiose kaum Octopin gebildet. Im nächsten Abschnitt soll ein Mechanismus vorgestellt werden, der die Opinbildung auch bei gleichbleibender Enzymaktivität beeinflußt.

4.2.3 Das Reaktionsgleichgewicht

Die Herzmuschel Cardium tuberculatum bildet bei funktionsbedingter Anaerobiose Octopin und bei biotopbedingter Anaerobiose D-Laktat. Obwohl die Muschel neben D-Laktat- und Octopin- auch Strombin- und Alanopindehydrogenase besitzt,

läßt sich keine Strombin- oder Alanopinakkumulation nachweisen. Die kinetischen Eigenschaften der Pyruvatreduktasen bieten auch in diesem Tier nur eine unvollständige Erklärung dieses Phänomens (Meinardus-Hager, 1986). Dieser Umstand ließ Meinardus-Hager (1986) den Gedanken in die Diskussion einbringen, daß nicht nur die Enzymaktivität sondern auch die Gleichgewichtslage der einzelnen Reaktionen die glykolytische Endproduktbildung beeinflußt. Er postuliert für C. tuberculatum, daß auf Grund der Gleichgewichtslage der Reaktionen unter physiologischen Bedingungen die D-Laktatbildung gegenüber Opinbildung bevorzugt ist. Die Octopinbildung bei funktionsbedingter Anaerobiose diskutiert er als einen transitorischen Zustand, der nur dadurch entsteht, daß die D-Laktatdehydrogenase das Gleichgewicht nicht schnell genug einstellen kann. Er begründet die fehlende Alanopin- und Strombinbildung mit den geringen Glycinkonzentrationen in diesen Tieren sowie mit einer Hemmung der Alanopin/Strombindehydrogenase durch Propionat.

Diese Gedanken wurden von Siegmund (1986) aufgegriffen, und auf den Dualismus der Opinbildung in einer Reihe von marinen Spezies angewendet. Siegmund fand, daß das Konzentrationsverhältnis der bei biotopbedingter Anaerobiose gebildeten Opine in vielen Fällen exakt dem Verhältnis der korespondierenden Aminosäuregehalte entspricht, d.h. Tiere mit einem 10fach höheren Glycin als Argingehalt produzieren auch 10 mal mehr Strombin als Octopin. Er postulierte, daß das konstante Aminosäure/Opin-Verhältnis darauf zurückzuführen ist, daß die Gleichgewichtskonstanten aller drei Reaktionen identisch sind und alle Dehydrogenasen in den relativ langen Zeiträumen der biotopbedingten Hypoxie ihr Reaktionsgleichgewicht einstellen können. Da die allgemeine Reaktionsgleichung der Opindehydrogenasereaktion lautet:

$$K'_{eq} = \frac{[\text{Pyruvat}] \cdot [\text{Aminosäure}] \cdot [\text{NADH}] \cdot [H^+]}{[\text{Opin}] \cdot [\text{NAD}^+]}$$

ist für eine bestimmte Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt

die Konzentration von Pyruvat, NADH, NAD^+ und H^+ für alle Opindehydrogenase-Gleichgewichte dieselbe:

$$K'_{eq} = \text{const} \cdot \frac{[\text{Aminosäure}]}{[\text{Opin}]}$$

Wenn auch die Gleichgewichtskonstanten die gleichen sind, und alle Enzyme nahe dem Gleichgewicht katalysieren, bestimmt die Konzentration der Aminosäure die Konzentration des korrespondierenden Opins.

Die experimentelle Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten (s. 3.3.3) von $3 \cdot 10^{-13}$ M^2 für die Octopindehydrogenase und $0.5 \cdot 10^{-13}$ M^2 für die Strombindehydrogenase zeigt, daß beide Konstanten in der gleichen Größenordnung liegen. Sie stehen in guter Übereinstimmung mit den von Meinardus-Hager & Gäde (1986b) ermittelten Konstanten. Die Autoren geben auch für die Alanopindehydrogenase einen Wert in diesem Bereich an ($1 \cdot 10^{-13}$ M^2).

Um mit Hilfe dieser Hypothese einen Dualismus der anaeroben Endproduktbildung erklären zu können, muß man für die Situation der funktionsbedingten Anaerobiose jedoch annehmen, daß sich nicht alle Opindehydrogenasen im Gleichgewicht befinden, sondern nur die, die in hohen Aktivitäten im Gewebe vorhanden sind (s. Siegmund, 1986; Meinadus-Hager,1986; sowie 4.2.2).

Eine Anwendung der Gleichgewichtshypothese auf den Dualismus der anaeroben Endproduktbildung des Introvertretraktors hätte folgende Konsequenzen:

1. Bei biotopbedingter Anaerobiose katalysieren alle Dehydrogenasen nahe dem Gleichgewicht und es wird vorwiegend Strombin als Endprodukt der anaeroben Glykolyse gebildet, da die Glycinkonzentration sehr viel höher ist, als die der anderen Aminosäuren.

Tabelle 12 (S. 77) zeigt, daß der Glycingehalt noch um den Faktor 10 höher ist, als der maximal gemessene Arginin- und Alaningehalt.

2. Bei funktionsbedingter Anaerobiose wird vorwiegend Octopin gebildet, da die Strombindehydrogenase ihr Reaktionsgleichgewicht in den kurzen Zeiträumen der Aktivität nicht einstellen kann und nur die Octopindehydrogenase nahe dem Gleichgewicht katalysiert.

Im letzen Kapitel konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß die Aktivität der Strombindehydrogenase dem hohen Glykolysefluß bei funktionsbedingter Anaerobiose nicht folgen kann.

3. Wenn diese Hypothese zutrifft, so sollte sich die Octopindehydrogenasereaktion in beiden Situationen nahe dem Gleichgewicht befinden. Da jedoch unter den Bedingungen der funktionsbedingten Anaerobiose bis zu 4 umol/g FG Octopin gebildet werden, bei langfristiger Hypoxie aber maximal 0.2 umol/g FG, muß man postulieren, daß auch die anderen Parameter, die in das Reaktionsgleichgewicht eingehen, sich bei funktionsbedingter Anaerobiose sehr viel stärker ändern als bei biotopbedingter Anaerobiose. Nach dem Massenwirkungsgesetz ist die Relation der Pro- und Edukte der Reaktion eine Konstante:

$$K'_{eq} = \frac{[\text{Pyruvat}] \cdot [\text{Arginin}] \cdot [\text{NADH}] \cdot [H^+]}{[\text{Octopin}] \cdot [NAD^+]}$$

Wenn also der Octopingehalt um den Faktor 2 steigt, muß entweder der NAD^+-Gehalt -bei konstanter Konzentration der Edukte- auf die Hälfte sinken, oder der Pyruvat-, Arginin- NADH- oder H^+-Gehalt müssen entsprechend ansteigen.

Eine Bestimmung der Gehalte aller Reaktanden sollte diese Frage klären, und macht gleichzeitig eine Prüfung der Gleichgewichtshypothese möglich; denn wenn sich die Reaktion

tatsächlich nahe dem Gleichgewicht befindet, dürfte sich das Verhältnis der Produkte und der Edukte der Reaktion im Versuchszeitraum nur geringfügig verändern. Im idealen thermodynamischen Gleichgewicht müßte es der Gleichgewichtskonstanten der Reaktion entsprechen.

Da die Protonenkonzentration sich mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht direkt bestimmen ließ (s. 3.3.2) wurde dieser Wert nach Pörtner (1987) rechnerisch abgeschätzt. Tabelle 14 (S. 82) zeigt, daß sich der pH_i um höchstens 0.1 pH-Einheit verändert. Das entspricht einer Änderung der Protonenkonzentration um den Faktor 1.26. Die Abschätzung des pH_i steht in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen von Chih & Ellington (1985), die Veränderungen des intrazellulären pH des kontrahierenden Adduktors von Argopecten irradians concentricus mit Hilfe der Kernresonanzspektroskopie bestimmten. Sie fanden eine Alkalose um 0.09 pH-Einheiten gegenüber dem Kontrollwert (pH 7.06) nach 40 Kontraktionen und eine leichte Acidose von 0.12 pH-Einheiten nach 200 Kontraktionen. Tabelle 14 (S.82) zeigt für den Introvertretraktor eine geringfügige Alkalose von 0.03 pH-Einheiten zu Beginn der Kontraktionsperiode, die vor allem durch den Abbau des Argininphosphats zustande kommt. Die leichte Acidose um 0.1 pH-Einheiten nach 1 h Kontraktion ist vor allem durch die glykolytisch gebildeten Protonen bedingt (s. Pörtner et al., 1984b).

Für die Abschätzung des pH_i bei der biotopbedingten Anaerobiose konnte eine eventuelle Produktion von Protonen, die mit der Bildung von Acetat und Propionat verbunden ist nicht berücksichtigt werden. Doch auch wenn in dem untersuchten Zeitraum Fettsäuren gebildet werden, dürfte der pH_i sich um höchstens 0.1 Einheit verändern. Eine signifikante Acidose konnten Pörtner et al. (1984c) im Hautmuskelschlauch und im Retraktor hypox inkubierter Tiere erst nach 24 h Anaerobiose nachweisen.

Für die vorliegenden Untersuchungen ist vor allem festzuhalten, daß sich der pH_i sowohl bei funktionsbedingter als

auch bei biotopbedingter Anaerobiose nur geringfügig verändert. Der Effekt dieser pH-Änderungen auf das Gleichgewicht der Opindehydrogenasereaktionen ist sowohl für die biotopbedingte als auch für die funktionsbedingte Anaerobiose minimal. Falls sich die Octopindehydrogenasereaktion tatsächlich in beiden Situation nahe dem Gleichgewicht befindet, muß der Unterschied im Octopingehalt sein Äquivalent im Unterschied der Gehalte anderer Reaktionspartner haben.

a) Massenwirkungsquotienten

Tabelle 12 (S. 77) zeigt, daß sowohl der Pyruvat- als auch der Arginin- und NADH-Gehalt bei funktionsbedingter Anaerobiose stärker ansteigen als bei biotopbedingter Anaerobiose. Um zu ermitteln ob dieser Unterschied auch quantitativ den Gleichgewichtsbedingungen entspricht, wurden die Massenwirkungsverhältnisse (MAR = "mass action ratio"; Rollestone, 1972) der Octopin- und der Strombindehydrogenasereaktion bestimmt. Die Werte der Metabolitgehalte wurden dazu in intrazelluläre Konzentrationen umgerechnet und das Massenwirkungsverhältnis (MAR) nach

$$MAR = \frac{[\text{Pyruvat}] \cdot [\text{NADH}] \cdot [\text{Aminosäure}] \cdot [H^+]}{[\text{Opin}] \cdot [NAD^+]}$$

bestimmt. Für den Pyruvat-, Aminosäure-, Opin- und NAD^+-Gehalt wurden jeweils die Einzelwerte eingesetzt. Da der NADH-Gehalt nur in wenigen Fällen in denselben Muskeln bestimmt werden konnte wie die übrigen Metabolitgehalte, gingen für den jeweiligen Versuchszeitpunkt die NADH-Gehalte als Mittelwerte in die Rechnung ein. Für die Protonenkonzentration wurden die nach Pörtner (1987) ermittelten Werte (s. Tabelle 14, S. 82) eingesetzt.

In Abbildung 23 sind die berechneten Massenwirkungsverhältnisse gegen die Versuchszeit aufgetragen. Der Wert für die ODH-Reaktion liegt sowohl für die funktionsbedingte als auch

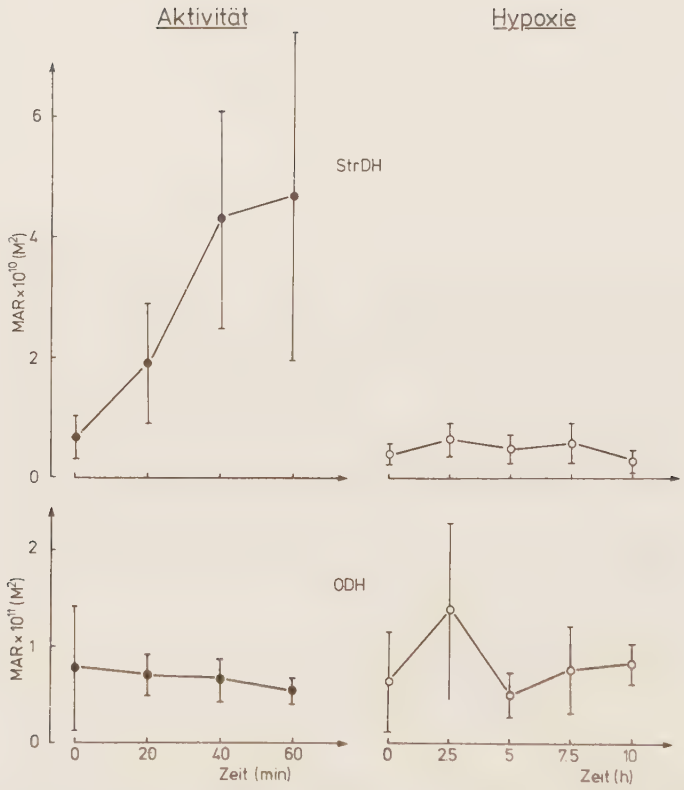


Abbildung 24: Massenwirkungsverhältnisse der Octopindehydrogenasereaktion (unteres Diagramm) und der Strombindehydrogenasereaktion (oberes Diagramm) im Introvertretraktor nach verschiedenen Zeiten der Aktivität (Kontraktionsfrequenz 0.1 Hz) und Hypoxie (Inkubation in stickstoffbegastem Seewasser).

für die biotopbedingte Anaerobiose im Bereich von $7 \cdot 10^{-12}$ M^2. Bis auf eine Abweichung um den Faktor 2 nach 2.5 h Hypoxie wurden für alle Versuchszeiten annähernd gleiche Werte ermittelt.

Obwohl also die Octopinkonzentration sowohl bei funktionsbedingter als auch bei biotopbedingter Anaerobiose ansteigt, verändern sich die Konzentrationsverhältnisse der Reaktionspartner nur geringfügig. Dies ist ein starkes Indiz dafür, daß die Octopindehydrogenase das Gleichgewicht zwischen Edukten und Produkten der Reaktion in beiden Fällen einstellen kann.

Für die Strombindehydrogenase ergibt sich ein konstanter Wert des berechneten Massenwirkungsverhältnisses nur für die biotopbedingte Anaerobiose (um $5 \cdot 10^{-11}$ M^2). Bei funktionsbedingter Anaerobiose weicht der Wert zunehmend vom Kontrollwert ab. Wie bereits anhand der Aktivität und der kinetischen Eigenschaften des Enzyms vermutet wurde (s. 4.2.2), kann das Reaktionsgleichgewicht in dieser Situation nicht schnell genug eingestellt werden. Die Pyruvat- und die NADH-Konzentration steigen, ohne daß Strombin gebildet wird.

Diese Befunde stellen eine Bestätigung der Hypothese dar, daß die Strombindehydrogenasereaktion nur in ruhenden Muskeln bei langfristiger Hypoxie dem Gleichgewicht nahekommt. Die Octopindehydrogenasereaktion stellt sich sowohl bei funktionsbedingter als auch bei biotopbedingter Anaerobiose nahe dem Gleichgewicht ein, so wie es auch für die Lactatdehydrogenasereaktion im Vertebratenmuskel angenommen wird (Williamson et al., 1967).

Eine Alanopinbildung tritt in diesem Muskel nicht auf, da die kinetischen Eigenschaften des Enzyms (s.4.2.2) eine Gleichgewichtseinstellung nur in extrem langen Zeiträumen ermöglichen. Zudem liegen die Konzentrationen an L-Alanin noch unter denen des Octopins, so daß, auch wenn das Gleichgewicht eingestellt würde, nur sehr geringe Alanopinkonzentrationen zu erwarten sind.

b) Diskrepanz zwischen MAR und K_{eq}

Nach der Definition von Rollestone (1972) kann eine Reaktion dann als Gleichgewichtsreaktion bezeichnet werden, wenn sich das aus den Metabolitgehalten berechnete Massenwirkungsverhältnis um nicht mehr als den Faktor 5 von der Gleichgewichtskonstanten unterscheidet. Ein Unterschied um den Faktor 5 bis 20 stellt einen Übergangsbereich dar, während ein Faktor größer als 20 das Enzym als Nicht-Gleichgewichtsenzym klassifiziert, und es damit zu einem potentiellen Regulationspunkt des betreffenden Stoffwechselweges macht.

Wendet man diese Definition auf die Octopin- und Strombindehydrogenasereaktion im Introvertretraktor an, so unterscheiden sich die berechneten Massenwirkungsverhältnisse von den Gleichgewichtskonstanten für erstere Reaktion etwa um den Faktor 23, für letztere etwa um den Faktor 1000. Beide Enzyme müßten daher nach Rollestone als Nicht-Gleichgewichtsenzyme bezeichnet werden. Dies steht im Widerspruch zu der oben geschilderten Konstanz der Werte über den Versuchszeitraum, die vermuten läßt, daß sich ein Gleichgewicht zwischen Pro- und Edukten der Reaktion einstellt.

Als mögliche Erklärung dieser Diskrepanz wären folgende Punkte zu überdenken:

1. Die in vitro bestimmten Gleichgewichtskonstanten könnten nicht den tatsächlichen Werten entsprechen.

In Anbetracht der Tatsache, daß für die Octopindehydrogenasereaktion inzwischen von vier Autoren (Fields & Quinn, 1981; Meinardus-Hager & Gäde, 1986b; Chih & Ellington, 1986; diese Arbeit) Werte zwischen $1.4 \cdot 10^{-13}$ und $3.9 \cdot 10^{-13}$ M^2 ermittelt wurden, läßt eine fehlerhafte Bestimmung um mehr als den Faktor 10 relativ unwahrscheinlich erscheinen. Auch wenn man bedenkt, daß Faktoren wie z.B. die Ionenkonzentration den in vitro-Wert verändern können (s. Bücher et al., 1972).

Anhand der Metabolitgehalte, die Siegmund (1986) für verschiedene marine Invertebraten bestimmte, müßte allerdings die Gleichgewichtskonstante für beide Reaktionen die gleiche sein, da er ein konstantes Aminosäure/Opin-Verhältnis findet. Siegmund vermutet dies auch anhand des ähnlichen Chemismus der beiden Reaktionen (reduktive Kondensation einer Aminogruppe mit Pyruvat). Die Werte der Gleichgewichtskonstanten in vitro unterscheiden sich jedoch um den Faktor 6. Dazu sei angemerkt, daß die experimentelle Bestimmung (s. 2.11) der Gleichgewichtskonstanten der Strombindehydrogenase sehr viel problematischer ist als die der Octopindehydrogenasereaktion. Die Strombindehydrogenase stellt erst nach sehr langen Reaktionszeiten ein Gleichgewicht ein, und daher ist die Bestimmung des exakten Endpunktes der Reaktion mit einem relativ großen Fehler behaftet. Dies ließ sich auch durch die Verwendung des Enzyms aus Crassostrea angulata, das eine größere Volumenaktivität zeigte als das aus Sipunculus nudus, nicht verhindern. Der Wert für die Strombindehydrogenasereaktion ist daher nicht ganz so verläßlich.

Doch selbst wenn beide Konstanten den gleichen Wert von $3 \cdot 10^{-13}$ M^2 haben, weicht das berechnete Massenwirkungsverhältnis der Strombindehydrogenasereaktion noch um den Faktor 167 von der Gleichgewichtskonstanten ab. Die Abweichung der Octopindehydrogenasereaktion bliebe bei einem Faktor von 23.

2. Eine andere Möglichkeit wäre eine intrazelluläre Kompartimentierung der Metabolite, so daß die gemessenen Konzentrationen nicht mit denen übereinstimmen, die in vivo für das Reaktionsgleichgewicht wirksam sind.

Eine solche Kompartimentierung könnte man für das NADH erwarten. Sahlin & Katz (1986) schließen z.B. aus enzymatischen Messungen des NADH-Gehalts im Vertebraten Skelettmuskel, daß der gemessene Anstieg des NADH-Gehalts überwiegend auf einen Anstieg des mitochondrialen NADH zurückzuführen sei. Ferner postulieren sie, daß der Gehalt des ruhenden Muskels den mitochondrialen repräsentiert, da der Nucleotidspeicher der Mitochondrien sehr viel stärker reduziert sei

als der des Cytoplasmas.

Um diese Möglichkeit für den Introvertretraktor überprüfen zu können, muß man zunächst einmal abschätzen, wie groß der potentiell kompartimentierte Anteil des NADH in diesem Muskel ist. Man kann dazu den umgekehrten Weg wie oben beschrieben gehen, und unter der Voraussetzung, daß sich die ODH-Reaktion im Gleichgewicht befindet, die Konzentration an freiem cytoplasmatischen NADH in diesem Muskel berechnen (s. Williamson et al., 1967 für die Laktatdehydrogenasereaktion). Tabelle 19 zeigt, daß demnach weniger als 10 % des NADH cytoplasmatisches, freies NADH sind.

Tabelle 19: Freier NADH-Gehalt des Introvertretraktors bei Aktivität und Hypoxie (nmol/g FG), berechnet anhand des Gleichgewichts der Octopindehydrogenase ($K'_{eq} = 3 \cdot 10^{-13}$ M^2); % = prozentualer Anteil des berechneten freien NADH am enzymatisch gemessenen Gesamtgehalt.

Aktivität			Hypoxie		
Zeit (min)		%	Zeit (h)		%
0	0.07 ±0.06	3.9	0	0.06 ±0.05	4.3
20	0.13 ±0.04	4.2	2.5	0.05 ±0.04	2.0
40	0.16 ±0.06	4.4	5	0.12 ±0.06	6.0
60	0.21 ±0.06	5.5	7.5	0.08 ±0.05	3.8
			10	0.08 ±0.02	3.6

Geht man davon aus, daß erstens der Gesamt-Nucleotidgehalt ($NADH + NAD^+ = 60$ nmol/g FG) in Mitochondrien und Cytoplasma etwa gleich verteilt ist und, daß zweitens 90 % des NADH sich in den Mitochondrien befinden, da dort die Nucleotide stärker reduziert sind als im Cytoplasma, und setzt man drittens voraus, daß der höchste gemessene Wert einer maximalen Reduktion des mitochondrialen NADH entspricht ($NAD^+ = 0$), so müßten die Mitochondrien mindestens 6 % des Muskelvolumens einnehmen. Leider liegen für den Retraktor keine morphometrischen Untersuchungen des Mitochondriengehaltes vor. De Eguileor & Valvassori (1977) geben jedoch für große Bereiche der Längsmuskulatur von S. nudus einen Mitochondrienanteil von nur 0.1 % der Querschnittsfläche an. Es erscheint daher relativ unwahrscheinlich, daß das gesamte gemessene NADH mitochondriales NADH repräsentiert. Die Tatsache, daß auch die (berechnete) cytoplasmatische freie

NADH-Konzentration bei Aktivität ansteigt, deutet ebenfalls darauf hin, daß die Veränderungen des Gesamtgehaltes nicht ausschließlich Veränderungen im mitochondrialen Kompartiment darstellen.

Eine andere Art der Kompartimentierung besteht in einer Bindung des NADH an Proteine, wie sie schon unter 4.1 für das ADP diskutiert wurde. Bücher et al. (1972) postulieren, daß in der Vertebratenleber 90 % des NADH an die cytoplasmatischen Dehydrogenasen gebunden sind. Die Möglichkeit, daß auch im Introvertretraktor eine solche Bindung des NADH dessen freie Konzentration erniedrigt, soll am Beispiel der Octopindehydrogenase demonstriert werden:

Die spezifische Aktivität des nahezu homogenen Proteins beträgt 610 U/mg Protein. Der Retraktor enthält 229 U/g FG oder etwa 0.38 mg Octopindehydrogenase. Dieser Wert entspricht bei einem relativen Molekulargewicht von 43 000 einem Gehalt von 8.8 nMol/g FG oder 15 uMol/l Zellwasser (15 uM). Der NADH-Gehalt der Kontrollmuskeln beträgt im Mittel 1.6 nMol/g FG oder 2.8 uM. Der apparente K_m-Wert der Octopindehydrogenase für NADH beträgt 32 uM. Olomucki et al. (1972) bestimmten für die Octopindehydrogenase aus Pecten maximus eine Dissoziationskonstante (K_d) für NADH, die in der gleichen Größenordnung liegt (20 uM), sowie einen Wert von einer Bindungsstelle für NADH pro Proteinmolekül. NADH wird als erster der Reaktanden an das Enzym gebunden (Doublet & Olomucki, 1975; Shrimsher & Taylor, 1984). Nach der Gleichung (Cantor & Schimmel, 1980).

$$K_d = \frac{(n \cdot [Prot]_t - [L]_t + [L]_f) \cdot [L]_f}{([L]_t - [L]_f)}$$

K_d = Dissoziationskonstante (32 uM)
n = Anzahl der Bindungsstellen pro Proteinmolekül (1)
$[Prot]_t$ = Gesamtkonzentration des Proteins (15 uM)
$[L]_t$ = Gesamtkonzentration des Liganden (2.8 uM)
$[L]_f$ = Konzentration des freien Liganden

die sich aus der Gleichung für das Dissoziationsgleichgewicht ableiten läßt, kann man den Anteil an proteingebundenem Liganden (L_t - L_f) berechnen. Er beträgt bei einer Dissoziationskonstanten von 32 uM (K_m-Wert des Enzyms) 0.9 uM (0.52 nmol/g FG) oder etwa 32 % des gemessenen Gesamtgehaltes. Dieser Zahlenwert hängt stark von der Proteinkonzentration und von der Dissoziationskonstanten ab und kann deshalb nicht absolut gewertet werden. Die Überlegungen sollen jedoch demonstrieren, daß unter in vivo Bedingungen die NADH-Konzentration in diesem Muskel wahrscheinlich geringer ist, als die Konzentration der Octopindehydrogenase, und daß daher möglicherweise schon die Bindung des NADH an das Enzym die freie NADH-Konzentration signifikant erniedrigen kann. Auch eine Bindung an andere Dehydrogenasen oder andere Proteine wäre denkbar.

Nach Bücher et al. (1972) bewirkt eine solche Bindung eine scheinbare Erhöhung der apparenten Gleichgewichtskonstante, da das Dissoziationsgleichgewicht des NADH mit in die Reaktion eingeht. In dem von ihnen untersuchten System der Laktatdehydrogenase in der Vertebratenleber erhöht die intrazelluläre Bindung des NADH die apparente Gleichgewichtskonstante etwa um den Faktor 100. Wenn ähnliche Zusammenhänge auch für den Introvertretraktor gelten, ließe sich für die Octopindehydrogenasereaktion die Diskrepanz zwischen der apparenten Gleichgewichtskonstanten und dem berechneten Massenwirkungsverhältnis erklären.

Für die Strombindehydrogenasereaktion bliebe dann allerdings immer noch ein Faktor von 43 bzw. 7 (wenn beide Reaktionen die gleiche Konstante haben), der sich nicht erklären läßt. Ein Faktor von 7 würde die Strombindehydrogenase allerdings auch nach der Definition von Rolleston schon in den Übergangsbereich zwischen Gleichgewichts und Nicht-Gleichgewichtsenzymen rücken.

Interessanterweise tritt dieser Unterschied zwischen Octopin und Strombindehydrogenasereaktion, der sich auch darin ausdrückt, daß das Verhältnis von Glycin zu Strombin in diesem

Muskel höher ist als das von Arginin zu Octopin, in einer Reihe anderer mariner Invertebraten nicht auf (vgl. Siegmund, 1986). Auch im Hautmuskelschlauch von Sipunculus nudus, der niedrigere Glycinkonzentrationen aufweist, ist er nicht so stark ausgeprägt. Das Postulat, auch das Glycin sei im Introvertretraktor in irgendeiner Form kompartimentiert, scheint in Ermangelung von Fakten allzu opportunistisch. Die Klärung dieser Diskrepanz muß daher weiterführenden Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Die obigen Erörterungen lassen sich wie folgt zusammenfassen: Ein Teil des mit enzymatischen Methoden gemessenen NADH repräsentiert mitochondriales NADH, ein anderer Teil entspricht einer im Cytoplasma gebundenen Fraktion. Letztere ist vermutlich größer als der mitochondriale Anteil. Da nur etwa 5 % des gemessenen NADH-Gehaltes dem freien cytoplasmatischen Gehalt entsprechen, weichen die berechneten Massenwirkungsverhältnisse der Opindehydrogenasereaktionen von den apparenten Gleichgewichtskonstanten ab. Ein noch unbekannter Faktor, der möglicherweise ein Spezifikum des Introvertretraktors darstellt, bewirkt eine scheinbare oder tatsächliche Gleichgewichtsverschiebung der Strombindehydrogenasereaktion.

4.2.4 Wechselwirkungen der Pyruvatreduktasen mit anderen Dehydrogenasen

In den vorangegangenen Ausführungen wurden die Opindehydrogenasen relativ isoliert betrachtet, abschließend sei jedoch auch auf ihre Wechselwirkungen mit anderen Redoxsystemen hingewiesen. Diese lassen sich besonders gut am Beispiel der Octopindehydrogenase darstellen:

Betrachtet man die Pyruvat und NADH-Gehalte der Retraktoren bei funktionsbedingter Anaerobiose, so fragt man sich, wie eine stöchiometrische Produktion von Pyruvat und NADH in der glykolytischen Reaktionssequenz zu einem unterschiedlichen Anstieg des Pyruvat und des NADH-Gehaltes führen kann; denn

auch die Octopindehydrogenase verbraucht Pyruvat und NADH nur im Verhältnis 1 : 1. Der Pyruvatgehalt steigt um 186 nmol/g FG, der NADH-Gehalt jedoch maximal um 2 nmol/g FG. Wären Octopindehydrogenase und Strombindehydrogenase das einzige cytoplasmatische Redoxsystem, so könnte es in keinem Fall zu einer solchen Pyruvatakkumulation kommen. Berechnet man ausgehend von den Pyruvat- und NADH-Gehalten nach 1 stündiger Aktivität die Werte, die sich ergäben, wenn Pyruvat und NADH in stöchiometrischen Mengen gebildet werden, so kommt man zu dem Ergebnis, daß der Pyruvatgehalt nicht auf 210, sondern nur auf 41 nmol/g FG stiege, der NADH-Gehalt dagegen nicht auf 3.8 sondern bis auf 20 nmol/g FG.

Vorausgesetzt, daß das Pyruvat nicht durch andere Reaktionen gebildet wird, die nicht mit einer gleichzeitigen Produktion von NADH verbunden sind, so kommt der starke Anstieg des Pyruvatgehaltes allein dadurch zustande, daß NADH nicht nur durch die Octopindehydrogenase sondern auch durch andere cytoplasmatische Dehydrogenasen reoxidiert wird. Wie Abbildung 25 zeigt, steigt auch der Malat- und der Glycerin-3-Phosphatgehalt bei Aktivität an (s. Tabelle 13, S. 80).

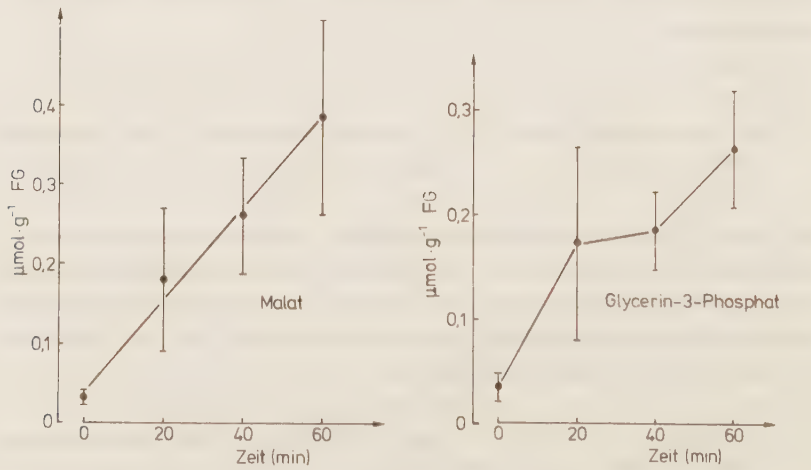


Abbildung 25: Malat- und Glycerin-3-Phosphatgehalt des Introvertretraktors im Verlauf der isometrischen Kontraktion bei einer Kontraktionsfrequenz von 0.1 Hz.

Die Differenz zwischen Pyruvat- und NADH-Akkumulation findet sich im Anstieg des Malat- und Glycerin-3-Phosphatgehaltes wieder. In Abbildung 26 sind die quantitativen Relationen zusammengefaßt. Die Zahlen geben die Erhöhung des stationären Gehalts der jeweiligen Metabolite nach 1 stündiger Aktivität an. Zusammengenommen übersteigt die Akkumulation des Malats und des Glycerin-3-Phosphats die Pyruvatakkumulation sogar noch um den Faktor zwei. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Pyruvatbildung größer ist als der Wert des Octopins plus des akkumulierten Pyruvats, da auch Pyruvat veratmet wurde. Bei einer dreifachen Steigerung der Atmung mit Pyruvat als alleinigem Substrat, müßten sogar noch etwa 150 nmol/g FG des glykolytisch gebildeten NADH in die Mitochondrien transportiert worden sein. Andererseits könnte ein Teil des Anstiegs des Malat- und Glycerin-3-Phosphatgehaltes auch einen Anstieg des mitochondrialen Redoxpotentials repräsentieren. Eine exakte Bilanz der cytoplasmatischen Redoxpartner ist daher nicht möglich. Es muß jedoch postuliert werden, daß der größte Teil des NADH, daß sich im Gleichgewicht der Octopindehydrogenasereaktion noch anhäufen würde, durch die cytoplasmatischen "Shuttle" Systeme oxidiert wird.

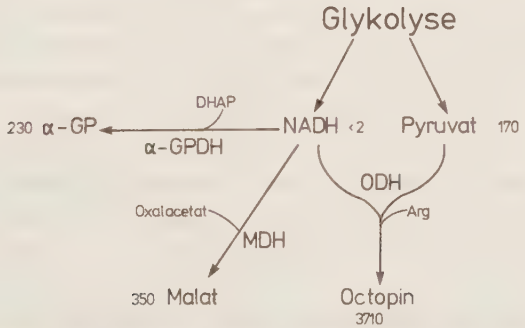


Abbildung 26: Mechanismen der Oxidation des glykolytisch gebildeten NADH. Die Zahlen geben die Erhöhung der stationären Konzentration der entsprechenden Metabolite (nmol/g FG) nach 1stündiger Kontraktion des Introvertretraktors (Frequenz 0.1 Hz) an. α-GP = Glycerin-3-Phosphat, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat.

Unter Ruhebedingungen dienen die Malat- und die Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase dem Transport des glykolytisch gebil-

deten NADH in die Mitochondrien. Auf Grund ihrer Gleichgewichtslage entziehen diese Reaktionen den Pyruvatreduktasen das NADH (zur Malatdehydrogenase s. Fields & Quinn, 1981; De Zwaan & Putzer, 1985). Dies gilt sowohl für den normoxen ruhenden Muskel, als auch für den kontrahierenden, wie Abbildung 26 und die obigen Überlegungen zeigen. Obwohl die Mitochondrien unter diesen Bedingungen nur einen geringen Teil oder gar keine Redoxäquivalente reoxidieren, und Malat und Glycerin-3-Phosphat sich anhäufen, wird das NADH/NAD-Verhältnis nicht allein durch die Octopindehydrogenase bestimmt. Erst das Zusammenwirken von Octopindehydrogenase und Malat- bzw Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase erklärt den Befund, daß sich 4 umol/g FG Octopin anhäufen können und damit 6 umol/g FG ATP gebildet werden können, wobei das NADH/NAD-Verhältnis nur um den Faktor 3 steigt.

4.3 Pyruvatreduktasen und Evolution

Die Mannigfaltigkeit der Pyruvatreduktasen in den verschiedenen Tierstämmen und die Mannigfaltigkeit der glykolytischen Endproduktbildung in unterschiedlichen physiologischen Situationen wirft die Frage auf, warum in der Evolution so viele verschiedene Arten der Pyruvatreduktion entstanden sind. Genau genommen hat diese Frage zwei Aspekte:

1. Warum bilden Vertebraten und Arthropoden ausschließlich Laktat, während viele Anneliden und Mollusken "Opine" bilden ?

2. Warum bilden viele marine Invertebraten in verschiedenen physiologischen Situationen verschiedene Endprodukte ?

Die erste Frage hat viele Autoren dazu veranlaßt, die Vor- und Nachteile der Laktat- und der Opinproduktion zu überdenken. Bowlus & Somero (1979) postulieren, daß eine Kondensation von Pyruvat mit einer Aminosäure den osmotischen Effekt aufhebt, den eine Umwandlung von Glykogen in ein lösliches

Endprodukt hat. Ein großer Teil der Opinproduzierer sind jedoch marine Spezies, die ohnehin schon einen hohen intrazellulären osmotischen Wert haben, der durch hohe Konzentrationen an freien Aminosäuren erreicht wird. Bei einer Aminosäurekonzentration von 200 - 400 mM dürfte sich eine Akkumulation von 10 - 20 mM eines Endprodukts kaum auswirken.

Auch das Argument, eine Octopinproduktion verändere den intrazellulären pH weniger als eine Laktatakkumulation (Zammit, 1978) ist fragwürdig. Nach Pörtner et al. (1984b) hat die Akkumulation beider Endprodukte die gleiche Protonenakkumulation zur Folge, da die Protonen nicht in der Pyruvatreduktasereaktion, sondern in der Reaktion der Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase gebildet werden.

Einleuchtender erscheint die Erklärung von Fields & Quinn (1981), daß die Kondensation von Pyruvat mit einer Aminosäure ein niedrigeres intrazelluläres Redoxpotential ($NADH/NAD^+$) ermöglicht, als die Reduktion von Pyruvat zu Laktat. Die Autoren konnten dies anhand von Computersimulationen der Laktat-, Octopin- und Malatdehydrogenasereaktion zeigen. Nach ihren Berechnungen ist das in dieser Hinsicht vorteilhafteste System das der Malatdehydrogenase. Dies gilt auch für ein Octopin/Malatdehydrogenasesystem, wie es im Introvertretraktor vorliegt (s. 4.2.4).

Eine Erhöhung des intrazellulären Redoxpotentials können allerdings viele laktatbildende Spezies dadurch umgehen, daß sie das gebildete Laktat aus dem Gewebe ausscheiden. Fast allen anderen "Opinbildnern" scheint eine solche Ausscheidung nicht möglich zu sein. Sie ist für die Tiere auch in sofern problematisch, da der Aminosäureanteil des Opins dann in das Gewebe zurücktransportiert, oder dort neu synthetisiert werden müßte.

Es bleibt die Frage, ob nicht die Tatsache, daß viele marine Invertebraten mehrere Pyruvatreduktaseaktivitäten haben, die in unterschiedlichen physiologischen Situationen genutzt werden, einen funktionellen Vorteil hat.

Als ein entscheidender Vorteil der Octopinbildung bei funktionsbedingter Anaerobiose wurde oft eine Integration von Phosphagenabbau und Octopinakkumulation gesehen. Doch da die Octopinakkumulation in den meisten Fällen nur einen geringen Teil des beim Phosphagenabbau entstehenden Arginins verbraucht ist dieser Effekt nicht überzeugend (s. 4.1). Zudem besteht nicht in allen Fällen ein solcher Zusammmenhang zwischen Phosphagen und Opin. A. marina z.B. akkumuliert bei Aktivität Alanopin, sein Phosphagen ist jedoch Taurocyaminphosphat. Viele Crustaceen besitzen Laktatdehydrogenase und Argininphosphat.

Die Begründung, die von Grieshaber (Grieshaber & Kreutzer, 1987) für eine duale Endpoduktakkumulation gegeben wird, erscheint plausibler: Da die Opindehydrogenasen einer starken Hemmung durch ihre jeweiligen Endprodukte unterliegen, könnte es für ein Tier von Vorteil sein, wenn es bei Aktivität ein anderes Endprodukt bildet als bei Hypoxie. Denn wenn durch Zufall eine Fluchtreaktion einer Periode der Hypoxie folgt, könnte z.B. die Akkumulation von Octopin die Hemmung der Strombindehydrogenase durch ihr Endprodukt Strombin umgehen.

Eine andere spekulative Erklärung wäre die, daß die hohen cytoplasmatischen Pyruvat- und Malatgehalte, die mit der Octopinbildung in der funktionsbedingten Anaerobiose auftreten (s..4.2.4), für die aerobe Energiegewinnung während und nach der Aktivität förderlich sind. Bei biotopbedingter Anaerobiose könnte die Aufrechterhaltung eines möglichst niedrigen Redoxpotentials ($NADH/NAD^+$) vorrangig sein.

Es ist sehr schwer, zu differenzieren, wie weit der Unterschied in der Pyruvat- und Malatakkumulation bei funktionsbedingter und biotopbedingter Anaerobiose (s. 3.3.1) die Folge der Akkumulation unterschiedlicher Opine ist, da die Reaktion in vivo mit anderen verzahnt ist (z.B. Malatdehydrogenase, Argininkinase). Für das isolierte System kann man jedoch feststellen, daß der relative Anstieg des Pyruvat und des NADH-Gehaltes um so höher wird, je niedriger die

Konzentration der korrespondierenden Aminosäure ist. Möglicherweise führen die funktionsbedingten Dehydrogenasen, die immer mit niedrigeren Aminosäurekonzentrationen arbeiten, zu höheren Pyruvatgehalten und zu höheren Redoxpotentialen als die biotopbedingten.

Für die biotopbedingte Anaerobiose, die sehr lange Zeiträume überbrücken muß, sollte möglichst lange ein niedriges cytoplasmatisches Redoxpotential aufrechterhalten werden. In den kurzen Zeiträumen der Aktivität könnte jedoch ein kurzfristiger Anstieg des Pyruvatgehaltes und des Redoxpotentials für die aerobe Energiegewinnung förderlich sein. In diesen Muskeln ist das Phosphagen bei Aktivität der wichtigste Energielieferant, die Kapazität des Phosphagenspeichers jedoch begrenzt. Nach beendeter Aktivität muß dieser Speicher möglichst schnell wieder aufgefüllt werden, um das Tier für die nächste Fluchtreaktion vorzubereiten. Ein erhöhter Pyruvat- und Malatgehalt könnte möglicherweise die mitochondriale ATP-Produktion in der Erholungsphase begünstigen, da dann die Mitochondrien besser mit Substrat versorgt werden können.

Ob dies tatsächlich der Fall ist, hängt wesentlich von den Zusammenhängen zwischen Glykolyse, NADH-Transportmechanismen und mitochondrialer Funktion ab, z.B. von der Frage, welche Komponente die mitochondriale ATP-Produktion im ruhenden und welche sie im kontrahierenden Muskel begrenzt. Hier eröffnet sich ein weites Feld für zukünftige Untersuchungen, die nicht nur dazu beitragen könnten, die Evolution eines Dualismus der anaeroben Endproduktbildung verständlich zu machen, sondern auch einen Beitrag zum allgemeinen Verständnis der Regulation des Energiestoffwechsels leisten könnten. In der vorliegenden Arbeit konnte am Beispiel des Dualismus der anaeroben Endproduktbildung aufgezeigt werden, daß es nicht immer eines spezifischen regulatorischen Mechanismus bedarf, um unterschiedliche Stoffwechselreaktionen zu aktivieren. Oft liegt das regulatorische Prinzip in der Reaktion selbst und in ihrer Wechselwirkung mit anderen Stoffwechselwegen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Viele marine Invertebraten gewinnen bei starker Muskelaktivität (funktionsbedingte Anaerobiose) und bei Sauerstoffmangel im Biotop (biotopbedingte Anaerobiose) Energie aus der anaeroben Glykolyse. Dieser Stoffwechselweg wird in vielen Spezies durch die sogenannten Opindehydrogenasen terminiert, die eine reduktive Kondensation von Pyruvat mit einer Aminosäure katalysieren. In dem Sipunculiden Sipunculus nudus L. führt die anaerobe Reduktion des Pyruvats bei funktionsbedingter Anaerobiose zum Endprodukt Octopin (Arginin + Pyruvat), bei biotopbedingter Anaerobiose jedoch zum Endprodukt Strombin (Glycin + Pyruvat).

Die Regulation dieses Dualismus der anaeroben Endproduktbildung, sowie die Bedeutung der verschiedenen Mechanismen der anaeroben Energiegewinnung wurden an isolierten Introvertretraktoren dieses Tieres untersucht. Muskelaktivität wurde dabei durch isometrische, elektrische Stimulation ausgelöst, eine Hypoxie durch Inkubation der Muskeln in N_2-begastem Seewasser.

Eine allgemeine Charakterisierung des Energiestoffwechsels ergab, daß Argininphosphat, das Phosphagen des Tieres, die Haupt-Energiequelle des Muskels darstellt. Kontrahierende Muskeln zeigen sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie eine exponentielle Abnahme des Phosphagengehaltes sowie einen exponentiellen Abfall der Kraftentwicklung. Succinat akkumuliert in kontrahierenden Muskeln nur unter Hypoxie, während alle anderen Metabolite des anaeroben Energiestoffwechsels unter Normoxie und Hypoxie ähnliche Veränderungen zeigen. Dies wird als Hinweis gewertet, daß ein anaerober Energiestoffwechsel auch bei ausreichender Sauerstoffversorgung ablaufen kann.

Die anaerobe Glykolyse führt in isometrisch kontrahierenden Muskeln sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie zum Endprodukt Octopin (Arginin + Pyruvat), bei Hypoxie in Ruhe jedoch zu Strombin (Glycin + Pyruvat). Durch Reinigung und

Charakterisierung der Enzyme konnte gezeigt werden, daß diese Endproduktbildung von zwei verschiedenen Enzymproteinen, einer Alanopin/Strombin- (StrDH) und einer Octopindehydrogenase (ODH), katalysiert wird.

Die Aktivität der StrDH ist unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich zu gering, um bei dem hohem Glykolysefluß, der bei Muskelaktivität erreicht wird, (25mal höher als bei Hypoxie) die Reduktion des glykolytischen Pyruvats zu katalysieren. Unter diesen Bedingungen wird daher vorwiegend Octopin akkumuliert.

Die Bildung unterschiedlicher Opine bei biotopbedingter Anaerobiose erklärt eine Hypothese, die von Meinardus-Hager (1986) und Siegmund (1986) vorgeschlagen wurde: Bei niedrigem Glykolysefluß wird die Opinkonzentration durch die Konzentration der korrespondierenden Aminosäure bestimmt, da alle Opindehydrogenasen nahe ihren Reaktionsgleichgewichten katalysieren.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die Gehalte aller Reaktanden der Opindehydrogenasereaktionen bei Aktivität und Hypoxie bestimmt. Das aus den Daten berechnete Massenwirkungsverhältnis ist für die ODH-Reaktion im Verlauf der isometrischen Kontraktion sowie bei 10stündiger Hypoxie konstant. Das Massenwirkungsverhältnis der StrDH ist ebenfalls bei Hypoxie konstant, ändert sich jedoch im Verlauf der funktionsbedingten Anaerobiose beträchtlich. Diese Daten bestätigen die Hypothese, daß beide Dehydrogenasen bei langfristiger Hypoxie nahe ihrem Gleichgewicht katalysieren. Es wird daher in dieser Situation vorwiegend Strombin akkumuliert, da die Glycingehalte des Retraktors sehr viel höher sind als die Argininggehalte.

Eine Diskrepanz zwischen den Massenwirkungsverhältnissen und den experimentell bestimmten apparenten Gleichgewichtskonstanten der Reaktionen könnte durch intrazelluläre Bindung oder Kompartimentierung des NADH bedingt sein.

6. LITERATUR

Atkinson, D.E. (1968): The energy charge of the adenylate pool as a regulative parameter. Interaction with feedback modifiers. Biochem. **7**, 4030-4034.

Beis, I. and Newsholme, E.A. (1975): The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. Biochem. J. **152**, 23-32.

Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Möllering, H. und Pfleiderer, G. (1974a): L-Aspartat and L-Asparagin. In: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse. Bd. II, 1741-1745. Verlag Chemie, Weinheim.

Berzelius, J. (1848): In: Jahresberichte über die Fortschritte der Chemie und Mineralogie **27**, 585.

Bessmann, S.P. and Geiger, P.J. (1981): Transport of energy in muscle: The phosphorylcreatine shuttle. Science **211**, 448-452.

Borch, R.F., Bernstein, M.D. and Durst, H.D. (1971): The cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent. J. Am. Chem. Soc. **93**, 2897-2904.

Bowlus, R.D. and Somero, G. (1979): Solute compatibility with enzyme function and structure: Rationales for the selection of osmotic angents and end products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. J. Exp. Zool. **208**, 137-152.

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**, 248-254.

Brooks, G.A. (1986): Lactate production under fully aerobic conditions: the lactate shuttle during rest and exercise. Fed. Proc. **45**, 2924-2929.

Bücher, T., Brauser, B., Conze, A., Klein, F., Langguth, O. and Sies, H. (1972): State of oxidation-reduction and state of binding in the cytosolic NADH-system as disclosed by equilibration with extracellular lactate/pyruvate in hemoglobin-free perfused rat liver. Eur. J. Biochem. **27**, 301-317.

Bunge, G. (1889): Weitere Untersuchungen über die Atmung der Würmer. Hoppe Seyler´s Z. physiol. Chem. **14**, 318-324.

Cantor, C.R. and Schimmel, P.R. (1980): Biophysical Chemistry. II. Techniques for the study of biological structure and function. Freeman, San Francisco.

Chance, B., Leigh, J.S., Kent jr., J. and McCully, K. (1986): Metabolic control principles and ^{31}P NMR. Fed. Proc. **45**, 2915- 2920.

Chih, C.P. and Ellington, W.R. (1985): Metabolic correlates of intracellular pH change during rapid contractile activity in a molluscan muscle. J. Exp. Zool. **236**, 27-35.

Chih, C.P. and Ellington, W.R. (1986): Control of glycolysis during contractile activity in the phasic adductor muscle of the bay scallop, Argopecten irradians concentricus: Identification of potential sites of regulation and a consideration of the control of octopine dehydrogenase activity. Physiol. Zool. **59**, 563-573.

Collicut, J.M. and Hochachka, P.W. (1977): The anerobic oyster heart: coupling of glucose and aspartate fermentation. J. Comp. Physiol. **115**, 147-157.

Connett, R.J., Gayeski, T.E.J. and Honig, C.R. (1984): Lactate accumulation in fully aerobic, working, dog gracilis muscle. Am. Physiol. Soc. H120-H128.

Czok, R. und Lamprecht, W. (1974): Pyruvat, Phosphoenolpyruvat und D-Glycerat-2-phosphat. In: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse. Bd. II, 1491-1496. Verlag Chemie, Weinheim.

Dawson, M.J., Gadian, D.G. and Wilkie, D.R. (1980): Mechanical relaxation rate and metabolism studied in fatiguing muscle by phosphorous nuclear magnetic resonace. J. Physiol. (Lond.) **299**, 465-484.

De Eguileor, M. and Vavassori, R. (1977): Studies on the helical and paramyosinic muscles. VII. Fine structure of body wall muscles in Sipunculus nudus. J. Submicr. Cytol. **9**, 363-372.

De Zwaan, A. (1977): Anaerobic energy metabolism in bivalve molluscs. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. **15**, 103-187.

De Zwaan, A. and Zandee, D.I. (1972): Body distribution and seasonal changes in the glycogen content of the common sea mussel Mytilus edulis. Comp. Biochem. Physiol. **43A**, 53-58.

De Zwaan, A. and Wijsman, T.C.M. (1976): Anaerobic metabolism in bivalvia (mollusca) characteristics of anaerobic metabolism. Comp. Biochem. Physiol. **54B**, 313-324.

De Zwaan, A. and Zurburg, W. (1981): The formation of strombine in the adduktor muscle of the sea mussel Mytilus edulis L. Mar. Biol. Lett. 2, 179-192.

De Zwaan, A. and Dando, P.R. (1984): Phosphoenolpyruvate-pyruvate metabolism in bivalve molluscs. Mol. Physiol. **5**, 285-310.

De Zwaan, A. and Putzer, V. (1985): Metabolic adaptations of intertidal invertebrates to environmental hypoxia (a comparison of environmental anoxia to exercise anoxia). In: Physiological adaptations of marine animals. (ed. Laverack, M.S.) Company of Biologists Ltd., Cambridge.

De Zwaan, A., Thompson, R.J. and Livingstone, D.R. (1980): Physiological and biochemical aspects of the valve snap and valve closure responses in the giant scallop Placopecten magellanicus. II. Biochemistry. J. Comp. Physiol. **137**, 105-114.

Doublet, M.O. and Olomucki, A. (1975): Investigations on the kinetic mechanism of octopine dehydrogenase. I. Steady-state kinetics. Eur. J. Biochem. 5,1 75-183.

Eckert, R. und Randall, D. (1986): Tierphysiologie. Thieme-Verlag Stuttgart.

Ellington, W.R. (1980): Partial purification and characterisation of a broadly-specific octopine dehydrogenase from the tissues of the sea anemone Metridium senile. Comp. Biochem. Physiol. **67B**, 625-631.

Fields, J.H.A. (1976): A dehydrogenase requiring alanine and pyruvate as substrates from oyster adductor muscle. Fed. Proc. **37**, 1687.

Fields, J.H.A. and Quinn, J.F. (1981): Some theoretical considerations on cytosolic redox balance during anaerobiosis in marine invertebrates. J. theor. Biol. **88**, 35-45.

Fletcher, W.M. and Hopkins, F.G. (1907): Lactic acid in amphibian muscle. J. Physiol. (Lond.) **35**, 247-309.

Gadian, D.G., Radda, G.K., Brown, T.R., Chance, E.M., Dawson, M.J. and Wilkie, D.R. (1981): The activity of creatine kinase in frog skeletal muscle studied by saturation-transfer nuclear magnetic resonance. Biochem. J. **194**, 215-228.

Gäde, G. (1987): Leben ohne Sauerstoff: Die Rolle der anaeroben Glykolyse bei aquatischen wirbellosen Tieren. Verh. Dtsch. Zool. Ges. (im Druck).

Gäde, G. and Carlsson, K.-H. (1984): Purification and characterisation of octopine dehydrogenase from the marine nemertean Cerebratulus lacteus (Anopla: Heteronemerta): comparison with scallop octopine dehydrogenase. Marine Biol. **79**, 39-45.

Gäde, G. and Grieshaber, M.K. (1986): Pyruvate reductases catalyze the formation of lactate and opines in anerobic invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. **83B**, 255-272.

Graham, R.A., Ellington, W.R. and Chih, C.P. (1986): A saturation transfer phosphorous nuclear magnetic resonance study of arginine phosphokinase in the muscle of a marine mollusc. Biochim. Biophys. Acta **887**, 157-163.

Graßl, M. (1974): L-Alanin. Bestimmung mit GPT und LDH. In: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse. Bd. II, 1727-1731. Verlag Chemie, Weinheim.

Grieshaber, M.K. (1976): An enzymatic method for the estimation of octopine. Anal. Biochem. **74**, 600-603.

Grieshaber, M. (1982): Metabolic regulation of energy metabolism. In: Exogenous and endogenous influences on metabolic and neural control (Eds. A.D.F. Addink and N. Spronk). Vol. 1, 225-242. Pergamon Press, Oxford.

Grieshaber, M.K. and Gäde, G. (1976): The biological role of octopine in the squid, Loligo vulgaris Lam. J. Comp. Physiol. **108**, 225-232.

Grieshaber, M.K. and Kreutzer, U. (1987): Opine formation in marine invertebrates. Zoologische Beiträge **30**, 205-231.

Grieshaber, M.K., Kronig, E. and Koormann, R. (1978): A photometric estimation of phospho-L-arginine, arginine and octopine using homogenous octopine dehydrogenase isoenzyme 2 from the squid, Loligo vulgaris Lam. Hoppe-Seyler´s Z. Physiol. Chem. **359**, 133-136.

Haas, S., Thome-Beau, F., Olomucki, A. and van Thoai, N. (1973): Purification de l´octopine deshydrogenase de Sipunculus nudus. Etude comparative avec l´octopine deshydrogenase de Pecten maximus. C.R. Acad. Sci. Paris **276D**, 831-834.

Heisler, N. (1975): Intracellular pH of isolated rat diaphragm muscle with metabolic and respiratory changes of extracellular pH. Resp. Physiol. **23**, 243-255.

Heisler, N., Weitz, H. and Weitz, A.M. (1976): Extracellular and intracellular pH with changes of temperature in the dogfish Scylliorhinus stellaris. Resp. Physiol. **26**, 249-263.

Hochachka, P.W. (1980): Living without oxygen. Harvard University Press, Cambridge M.A.

Hochachka, P.W. and Somero, G. (1984): Biochemical Adaptation. Princeton University Press, Princeton, N.J.

Hochachka, P.W. (1985a): Fuels and pathways as designed systems for support of muscle work. J. exp. Biol. **115**, 149-164.

Hochachka, P.W. (1985b): Assessing metabolic strategies for surviving O_2 lack: role of metabolic arrest coupled with channel arrest. Mol. Physiol. **8**, 331-350.

Holwerda, D.A., Veenhof, P.R., Van Heugten, H.A.A. and Zandee, D.I. (1983): Modification of mussel pyruvate kinase during anaerobiosis and after temperature acclimation. Mol. Physiol. 3, 225-234.

Howald, H. (1980): Lactic acid and other metabolic indicators of anaerobiosis in normal subjects. In: Lactate - Physiologic, methodologic and pathologic approach. (eds. Moret, P.R. et al.). Springer Verlag, Berlin.

Jaworek, D., Gruber, W. und Bergmeyer, H.U. (1974): Adenosin-5´-diphosphat und Adenosin-5´-monophosphat. In: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse. Bd. II, 2178-2181. Verlag Chemie, Weinheim.

Jöbsis, F.F. (1963): Spectrophotometric studies on intact muscle. II. Recovery from contractile activity. J. Gen. Physiol. **46**, 929-969.

Jöbsis, F.F., Stainsby, W.N. (1968): Oxidation of NADH during contractions of circulated Mammalian skeletal muscle. Resp. Physiol. **4**, 292-300.

Jones, D.P. (1986): Intracellular diffusion gradients of O_2 and ATP. Am. J. Physiol. **250**, C663-C675.

Kammermeyer, Schmidt H. P. and Jüngling, E. (1982): Free energy change of ATP hydrolysis: A causal factor of early hypoxic failure of the myocardium? J. mol. cell. Cardiol. **14**, 267-277.

Kato, T., Berger, S.J., Carter, J.A. and Lowry, O.H. (1973): An enzymatic cycling method for nicotinamide-adenine-dinucleotide with malic and alcohol dehydrogenases. Anal. Biochem. **53**, 86-97.

Keifer, D.W. and Roos, A. (1981): Membrane permeability to the molecular and ionic forms of DMO in barnacle muscle. Am. J. Physiol. **240** C73-C79.

Klippenstein, G.L. (1980): Structural Aspects of Hemerythrin and Myohemerythrin. Amer. Zool. **20**, 39-51.

Klingenberg, M. (1974): Nicotinamid-adenin-dinucleotide (NAD, NADP, NADH, NADPH) Spektrophotometrische und fluorimetrische Verfahren. In: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse Bd. II, 2098-2099, Verlag Chemie, Weinheim.

Körner, M. (1985): Untersuchungen zur Korrelation von Arbeit, Sauerstoffverbrauch und Energiestoffwechsel von Sipunculus nudus L. unter hypoxen Bedingungen. Staatsexamensarbeit, Universität Düsseldorf.

Kreutzer, U. (1982): Untersuchungen zum Energiestoffwechsel an Muskelpräparaten von Sipunculus nudus L.. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms Universität Münster.

Lamprecht, W. und Trautschold, I. (1974): Adenosin-5′-triphosphat. Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. In: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse. Bd. II, 1283-1287. Verlag Chemie, Weinheim.

Latner, A.L. and Skillen, A.W. (1968): Isoenzymes in biology and medicine. Academic Press, London.

Livingstone, D.R. (1983): Invertebrate and vertebrate pathways of anaerobic metabolism: evolutionary considerations. J. geol. Soc. (London) **140**, 27-37.

Lohmann, K. (1934): Über die enzymatische Aufspaltung der Kreatinphosphorsäure; zugleich ein Beitrag zum Chemismus der Muskelkontraktion. Biochem. Z. **271**, 264-277.

Long, G.L. and Kaplan, N.O. (1968): D-lactate specific pyridine nucleotide lactate dehydrogenase in animals. Science **162**, 685-686.

Lowry, O.H. and Passonneau, J.V. (1972): A flexible system of enzymatic analysis. Acad. Press. New York.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265-275.

Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Schulz, D.W. and Rock, M.K. (1961): The measurement of pyridine nucleotides by enzymatic cycling. J. Biol. Chem. **236**, 2746-2755.

Maurer, R.H. (1968): Disk-Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Walter de Gruyter + Co., Berlin.

Meinardus, G. and Gäde, G. (1981): Anaerobic metabolism of the common cockle, Cardium edule. IV. Time dependent changes of metabolites in the foot and gill tissue induced by anoxia and electrical stimulation. Comp. Biochem. Physiol. **70B**, 271-277.

Meinardus-Hager, G. (1986): Untersuchungen zum anaeroben Energiestoffwechsel der Herzmuschel Cardium tuberculatum: Die Rolle der drei terminalen Dehydrogenasen der Glykolyse, D-Laktat, Octopin- und Alanopindehydrogenase, bei biotopbedingter und funktioneller Anaerobiose. Dissertation, Rheinische Friedrich Wilhelms Universität Bonn.

Meinardus-Hager, G. and Gäde, G. (1986a): The pyruvate branchpoint in the anaerobic energy metabolism of the jumping cockle Cardium tuberculatum L.: D-lactate formation during environmental anaerobiosis versus octopine formation during exercise. Exp. Biol. **45**, 91-110.

Meinardus-Hager, G. and Gäde, G. (1986b): The separate function of D-lactate-, octopine-, and alanopine dehydrogenases in the foot muscle of the jumping cockle Cardium tuberculatum during anaerobiosis. J. Comp. Physiol. **156B**, 873-881.

Meyerhof, O. (1928): Über die Verbreitung der Argininphosphorsäure in der Muskulatur der Wirbellosen. Arch. Sci. biol. Napoli **12**, 536-548.

Meyer, R.A., Sweeney, H.L. and Kushmerick, M.J. (1984): A simple analysis of the "phosphocreatine shuttle". Am. J. Physiol. **246**, C365-C377.

Michal, G. und Lang, G. (1974): L-(-)-Glycerin-3-phosphat. In: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse. Bd. II, 1460-1463. Verlag Chemie, Weinheim.

Nachtigall, W. (1981): Zoophysiologischer Grundkurs. Verlag Chemie, Weinheim.

Nishiki, K., Erecinska, M. and Wilson, D.F. (1978): Energy relationships between cytosolic metabolism and mitochondrial respiration in rat heart. Am. J. Physiol. **234**, C73-C81.

Olomucki, A., Huc, C., Lefebure, F. and van Thoai, N. (1972): Octopine dehydrogenase. Evidence for a single chain structure. Eur. J. Biochem. **38**, 261-268.

Oshino, N., Sugano, T., Oshimo, R. and Chance, B. (1974): Mitochondrial function under hypoxic conditions: The steady state of cytochrome a + a_3 and their relations to mitochondrial energy states. Biochim. Biophys. Acta **368**, 298-310.

Paul, R.J. (1983): Functional compartmentalization of oxidative and glycolytic metabolism in vascular smooth muscle. Am. J. Physiol. **244**, C399-C409.

Perry, S.V. (1952): The bound nucleotide of the isolated myofibril. Biochem. J. **51**, 495-499.

Pette, D. and Reichmann, H. (1982): A method for quantitative extraction of enzymes and metabolites from tissue samples in the milligram range. J. Histochem. Cytochem. **30**, 401-402.

Pörtner, H.O. (1982): Biochemische und physiologische Anpassungen an das Leben im marinen Sediment: Untersuchungen am Spritzwurm Sipunculus nudus L. Dissertation, Universität Düsseldorf.

Pörtner, H.O. (1987): Anaerobic metabolism and changes in the acid-base status: quantitative interrelationships and pH regulation in the marine worm Sipunculus nudus L. J. exp. Biol. (in press).

Pörtner, H.-O., Kreutzer, U., Siegmund, B., Heisler, N. and Grieshaber, M.K. (1984a): Metabolic adaptation of the intertidal worm Sipunculus nudus to functional and environmental hypoxia. Marine Biol. **79**, 237-247.

Pörtner, H.O., Heisler, N. and Grieshaber, M.K. (1984b): Anaerobiosis and acid-base status in marine invertebrates: a theoretical analysis of proton generation by anaerobic metabolism. J. Comp. Physiol. B **155**, 1-12.

Pörtner, H.O., Grieshaber, M.K. and Heisler, N. (1984c): Anaerobiosis and acid-base status in marine invertebrates: effect of environmental hypoxia on extracellular on intracellular pH in Sipunculus nudus L. J. Comp. Physiol. B **155**, 13-20.

Pörtner, H.O., Heisler, N. and Grieshaber, M.K. (1985): Oxygen consumption and mode of energy production in the intertidal worm Sipunculus nudus L.: Definition and characterization of the critical PO_2 for an oxyconformer. Resp. Physiol. **59**, 361-377.

Pörtner, H.O., Vogeler, S. and Grieshaber, M.K. (1986a): Recovery from anaerobiosis in the intertidal worm Sipunculus nudus. II. Gas exchange and changes in the intra- and extracellular acid-base status. J. exp. Biol. **122**, 51-64.

Pörtner, H.O., Vogeler, S. and Grieshaber, M.K. (1986b): Recovery from anaerobiosis in the intertidal worm Sipunculus nudus. I. Restoration of aerobic steady state energy metabolism. J. exp. Biol. **122**, 37-50.

Price, N.C. and Stevens, L. (1982): Fundamentals of enzymology. Oxford University Press, Oxford.

Reger, J.F. (1964): Identification of two types of muscle fibre in the proboscis retractor of Sipunculus. J. Cell. Biol. **23**, 123A-124A.

Rolleston, F.S. (1972): A theoretical background to the use of measured concentrations of intermediates in study of the control of intermediary metabolism. Curr. Top. Cell. Regul. **5**, 47-75.

Sahlin, K. and Katz, A. (1986): The content of NADH in rat skeletal muscle at rest and after cyanide poisoning. Biochem. J. **239**, 245-248.

Sato, M. and Gäde, G. (1986): Rhodoic acid dehydrogenase: a novel amino acid linked dehydrogenase from muscle tissue of Haliotis species. Naturwissenschaften **73**, 207-208.

Schell, J., Montagu, M., de Bendeleer, M., de Block, M., Depicker, A., de Wilde, M., Engler, g., Cenetello, C., Hernalsteens, M., Molsters, M., Senrinde, J., Silva, B., van Vliet, F. and Villarroel, R. Ö. (1979): Interactions and DNA transfer between Agrobacterium tumefaciens and the plant host. Proc. R. Soc. Lond. **B204**, 251-266.

Schmidt, R.F. und Thews, G. (1985): Physiologie des Menschen. Springer Verlag, Berlin.

Schöttler, U. (1977): The energy-yielding oxidation of NADH by fumarate in anaerobic mitochondria of Tubifex spec.. Comp. Biochem. Physiol. **58B**, 151-156.

Schöttler, U. (1982): Vergleichende Untersuchungen zum Anaerobiose-Stoffwechsel von Polychaten. Habilitationsschrift, Westfälische Wilhelms Universität, Münster.

Schöttler, U., Wienhausen, G. and Westermann, J. (1984): Anaerobic metabolism in the lugworm Arenicola marina L.: The transition from aerobic to anaerobic metabolism. Comp. Biochem. Physiol. **79B**, 93-103.

Schroff, G. and Schöttler, U. (1977): Anaerobic reduction of fumarate in the body wall musculature of Arenicola marina (Polychaeta). J. Comp. Physiol. **116**, 325-336.

Shick, J.M., De Zwaan, A. and De Bont, A.M.T. (1983): Anoxic metabolic rate in the mussel Mytilus edulis L. estimated by simultaneous direct calorimetry and biochemical analysis. Physiol. Zool. **56**, 56-63.

Shoubridge, E.A. and Hochachka, P.W. (1980): Ethanol: Novel End Product of Vertebrate Anaerobic Metabolism. Science **209**, 308-309.

Shrimsher, J.L. and Taylor, K.B. (1984): Octopine dehydrogenase from Pecten maximus: Steady-State Mechanism. Biochemistry **23**, 1348-1353.

Siegmund, B. (1982): Die Bedeutung der freien Aminosäuren für den anaeroben Stoffwechsel von Arenicola marina L. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms Universität, Münster.

Siegmund, B. (1986): Funktionsbedingte und biotopbedingte Hypoxien: Zur Bedeutung der Opine im anaeroben Energiestoffwechsel. Dissertation, Universität Düsseldorf.

Siegmund, B. und Grieshaber, M.K. (1983): Determination of meso-alanopine and D-strombine by high pressure liquid chromatography in extracts from marine invertebrates. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. **364**, 807-812.

Siegmund, B., Grieshaber, M., Reitze, M. and Zebe, E. (1985): Alanopine and strombine are end products of anaerobic glycolysis in the lugworm Arenicola marina L. Comp. Biochem. Physiol. **82B**, 337-345.

Storey, K.B. (1985): A re-evaluation of the pasteur effect: new mechanisms in anaerobic metabolism. Mol. Physiol. **8**, 439-461.

Storey, K.B. and Dando, P.R. (1982): Substrate specifities of octopine dehydrogenases from marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. **73B**, 521-528.

Tempe, J. (1983): Chemistry and biochemistry of open-chain imino-acids. In: Weinstein, B. (ed.): Chemistry and biochemistry of amino-acids, peptides and proteins. Vol. 7, Marcel Dekker, New York.

Theede, H., Ponat, A., Hiroki, K. and Schlieper, C. (1969): Studies on the resistance of marine bottom invertebrates to oxygen-deficiency and hydrogen sulphide. Marine Biol. **2**, 325-337.

Thompson, R.J., Livingstone, D.R. and De Zwaan, A. (1980): Physiological and biochemical aspects of the valve snap and valve closure responses in the giant scallop Placopecten magellanicus. I. Physiology. J. Comp. Physiol. **137**, 97-104.

Van Thoai, N. and Robin, Y. (1959): Metabolisme des derives guanidyles VIII. Biosynthese de l'octopine et repartition de l'enzyme l'operant chez les invertebres. Biochim. Biophys. Acta **35**, 446-453.

Van Thoai, N. and Roche, J. (1964): Sur la biochimie comparee des phosphagenes et leur repartition chez les animaux. Biol. Rev. **39**, 214-231.

Veech, R.L. (1978): Regulation of coenzyme potential by near equilibrium reactions. In: Microenvironments and metabolic compartimentation. (eds. Srere, P.A. and Estabrook, R.W.). pp. 17-64, Academic Press, New York.

Waddell, W.J. and Butler, T.C. (1959): Calculation of intracellular pH from the distribution of 5,5-Dimethyl-2,4-Oxazolidine-dion (DMO). Application to skeletal muscle of the dog. J. Clin. Invest. **38**, 720-729.

Warburg, O. und Christian, W. (1936): Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten (Pyridin Nucleotide). Biochem. Z. **287**, 291-328.

Wasserman, K. (1986): Anaerobiosis, lactate, and gas exchange during exercise: the issues. Fed. Proc. **45**, 2904-2909.

Wiesner, R. (1986): Succinatbildung im Säugerherzen unter Sauerstoffmangel: Wechselwirkungen zwischen Aminosäurestoffwechsel, Trikarbonsäurezyklus und Glykolyse. Dissertation, Universität Düsseldorf.

Williamson, D.H., Lund, P. and Krebs, H.A. (1967): The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. Biochem. J. **103**, 514-527.

Williamson, J.R. (1974): Succinat. In: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse. Bd. II, 1661-1666. Verlag Chemie, Weinheim.

Wilson, M.A. and Cascarano, J. (1970): The energy-yielding oxidation of NADH by fumarate in submitochondrial particles of rat tissues. Biochim. Biophys. Acta **216**, 54-62.

Wilson, D.F., Nishiki, K. and Erecinska, M. (1981): Energy metabolism in muscle and its regulation during individual contraction-relaxation cycles. TIBS **6**, 16-19.

Zammit, V.A. (1978): Possible relationship between energy metabolism of muscle and oxygen binding characteristics of hemocyanin of cephalopods. J. mar. biol. Ass. U.K. **58**, 421-424.

Zebe, E. (1975): In vivo Untersuchungen über den Glukose-Abbau bei Arenicola marina (Annelida, Polychaeta). J. Comp. Physiol. **101**, 133-145.

Zebe, E., Grieshaber, M.K. und Schöttler, U. (1980): Biotop-bedingte und funktionsbedingte Anaerobiose. BiuZ **10**, 175-182.

Druck und Verarbeitung: Dissertations Druck Darmstadt, Tel. 0 61 51 / 21 3 53